



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

Πτυχιακή Εργασία

**«ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΝΕΩΝ ΡΟΛΩΝ ΤΟΥ HIF-2 α ΣΤΗΝ ΠΡΟΣΑΡΜΟΓΗ ΤΗΣ
ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑΣ ΣΤΗΝ ΥΠΟΞΙΑ »**

ΣΤΥΜΟΝΙΑΡΗΣ ΕΥΑΓΓΕΛΟΣ
ΛΑΡΙΣΑ
ΣΕΠΤΕΜΒΡΙΟΣ 2024



UNIVERSITY OF THESSALY
FACULTY OF HEALTH SCIENCES
DEPARTMENT OF BIOCHEMISTRY AND BIOTECHNOLOGY

Bachelor Thesis

**“INVESTIGATING NEW ROLES OF HIF-2 α IN THE ADAPTATION OF
THE CELLULAR RESPONSE TO HYPOXIA”**

STYMONIARIS EVANGELOS
LARISA
SEPTEMBER 2024

Τριμελής εξεταστική επιτροπή

- Επιβλέπων καθηγητής:

Λιάκος Παναγιώτης, Καθηγητής του τμήματος Ιατρικής του
Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

- Συνεπιβλέπων καθηγητής:

Γιακουντής Αντώνιος, Επίκουρος καθηγητής του τμήματος Βιοχημείας και
Βιοτεχνολογίας του πανεπιστημίου Θεσσαλίας

- Μέλος Επιτροπής:

Μυλωνής Ηλίας, Αναπληρωτής καθηγητής του τμήματος Ιατρικής του
Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Ευχαριστίες

Με την ολοκλήρωση της πτυχιακής μου εργασίας στο εργαστήριο Βιοχημείας της Ιατρικής Λάρισας θα ήθελα να ευχαριστήσω όσους με βοήθησαν και ήταν κοντά μου σε αυτό το βήμα και αυτήν την χρονική περίοδο από την αρχή.

Για αυτό πρώτα οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ στον υπεύθυνο καθηγητή μου, τον κύριο Παναγιώτη Λιάκο ο οποίος με καθοδήγησε ορθά και με υπευθυνότητα και φυσικά με επέλεξε για την ερευνητική εργασία αυτή και είχα την δυνατότητα να εργαστώ με ένα βαθιά ενδιαφέρον για εμένα θέμα. Για αυτό και την σχέση εμπιστοσύνης που έδειξε μαζί μου τον ευχαριστώ άπειρα καθώς και για την υπομονή του και την προσεκτική και μεθοδική μετάβαση γνώσεων σε δύσκολα και λεπτομερή ερευνητικά θέματα, θέματα που αφορούν το εργαστήριο και τον κλάδο της Κλινικής Βιοχημείας, και πιο απλά και καθημερινά. Χωρίς αυτόν δεν θα ήταν δυνατή η διεξαγωγή της πτυχιακής μου εργασίας, χωρίς την εποικοδομητική και συμβουλευτική επίβλεψή του.

Παράλληλα θέλω να ευχαριστήσω θερμά τον κύριο Γιακουντή καθώς με την συμβολή του έγινε δυνατή η πραγματοποίηση της πτυχιακής μου εργασίας και φυσικά μου δόθηκε η δυνατότητα να εμβαπτίσω προηγούμενες φυσικές γνώσεις και να λειτουργήσω με άνεση σε θέματα που χρειάστηκε. Τον ευχαριστώ άπειρα για την σημαντική συμβολή και βοήθειά του σε ότι χρειάστηκα και ζήτησα την βοήθειά του.

Επίσης, ευχαριστώ πάρα πολύ τον κύριο Ηλία Μυλωνή που δέχθηκε να είναι μέρος της τριμελούς επιτροπής και να αξιολογήσει την ερευνητική μου εργασία καθώς είναι τιμή μου και τον κύριο Σίμο που με δέχτηκε στο εργαστήριο βιοχημείας. Ευχαριστώ όλα τα μέλη Δ.Ε.Π. του εργαστηρίου για την συμβολή και υποστήριξή τους.

Σε αυτό το σημείο θα ήθελα να ευχαριστήσω τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου που μου προσέφεραν την εμπειρία τους και τις γνώσεις τους κατά την πραγματοποίηση των πειραμάτων. Ευχαριστώ ιδιαίτερα την Κατερίνα που ήταν μαζί μου στις πειραματικές διαδικασίες. Την ευχαριστώ θερμά για την υπομονή της, για την πειραματική επίβλεψη και τις συμβουλές της. Πάνω από όλα ευχαριστώ την οικογένεια μου που καθημερινώς μου δίνουν κουράγιο και σιγουριά και χάρη σε αυτούς έγινε δυνατή η εισαγωγή μου στον κόσμο της Βιοχημείας και της εξέλιξης της.

Περιεχόμενα

Περίληψη.....	7
Abstract.....	8
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	9
1.1 Υποξία.....	9
1.2 Μεταγραφικοί παράγοντες HIF.....	9
1.3 Ο μεταγραφικός παράγοντας HIF-2α.....	11
1.4 Ρύθμιση του HIF-2α.....	12
1.4.1 Ρύθμιση του HIF-2α από τις συνθήκες οξυγόνου.....	12
1.4.2 Ρύθμιση του HIF-2α ανεξάρτητα από την παρουσία οξυγόνου.....	13
1.4.3 Μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις του HIF-2α.....	13
1.4.3.1 Φωσφορυλίωση του HIF-2α.....	14
1.4.3.2 Σουμοϋλίωση του HIF-2α.....	15
1.4.3.3 Ακετυλίωση του HIF-2α.....	15
1.4.4 Ρύθμιση του HIF-2α από την αλληλεπίδρασή του με άλλες πρωτεΐνες.....	16
1.4.4.1 Η αλληλεπίδραση της Ρεπτίνης 52 (Reptin 52) με τον HIF-2α.....	16
1.4.4.2 Αλληλεπίδραση του HIF-2α με τους ELK1 και ETS1.....	17
1.5 Γονίδια που επάγονται από τους HIF.....	17
1.6 Καρκίνος του ήπατος και HIF-2α.....	18
2. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ.....	20
3. ΥΛΙΚΑ-ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΑ.....	21
3.1 Προγράμματα.....	21
3.2 Κυτταρική σειρά καρκινικών κυττάρων.....	21
3.3 Χημικές ενώσεις- αντιδραστήρια-νουκλεϊκές αλληλουχίες.....	21
3.3.1 Εκκινητές που αξιοποιήθηκαν για την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (RT-qPCR).....	22
3.3.2 Αντισώματα.....	22
3.3.3 Διαλύματα.....	23
4. ΜΕΘΟΔΟΙ.....	29
4.1 ΜΕΤΑΓΡΑΦΟΜΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ.....	29
4.1.1 Στατιστική επεξεργασία δεδομένων RNA-seq.....	29
4.1.2 Δημιουργία οπτικών γραφημάτων ανάλυσης.....	29
4.1.3 Ανάλυση Οντολογίας.....	29
4.2 ΜΕΘΟΔΟΙ ΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ ΠΕΙΡΑΜΑΤΩΝ.....	30
4.2.1 Καλλιέργεια κυτταρικής σειράς Huh7.....	30
4.2.2 Ανακαλλιέργεια-μεταφορά αναπτυσσόμενων κυττάρων σε νέα πιάτα.....	30
4.2.3 Αποσιώπηση του HIF-2α σε κύτταρα Huh7 με χρήση si-RNA.....	31
4.2.4 Επώαση κυττάρων σε υποξία.....	31
4.2.5 Απομόνωση κυτταρικών εκχυλισμάτων.....	31
4.2.6 Ποσοτικοποίηση πρωτεϊνών με αντιδραστήριο Bradford.....	31
4.2.7 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνικού εκχυλίσματος σε πηκτή.....	33
πολυακρυλαμίδιου-SDS σε αποδιατακτικές συνθήκες.....	33
4.2.8 Μεταφορά πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης.....	33

4.2.9 Ανοσοαποτύπωση κατά Western Blot.....	34
4.2.10 Μέτρηση χημειοφωταύγειας λουμινόλης.....	35
4.2.11 Απομόνωση ολικού RNA.....	35
4.2.12 Σύνθεση cDNA.....	36
4.2.13 Αντίδραση αλυσιδωτής πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (RT-qPCR).....	37
4.2.14 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτής αгарόζης.....	39
5. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	41
5.1 Βιοπληροφορική ανάλυση RNA-seq.....	41
5.1.1 Μεταγραφομική Ανάλυση με αποσιώπηση του HIF-2α στην υποξία.....	41
5.1.2 Ανάλυση Οντολογίας.....	42
5.1.3 Ανάλυση Οντολογίας Αυξορρυθμιζόμενων Γονιδίων.....	43
5.1.4 Ανάλυση Οντολογίας Μειορρυθμιζόμενων Γονιδίων.....	48
5.2 Γονίδια που επιλέχθηκαν από την Βιοπληροφορική Ανάλυση.....	53
5.2.1 Γονίδιο HJV.....	53
5.2.2 Γονίδιο SKP2.....	54
5.2.3 Γονίδιο SEPARIN.....	55
5.3 Πειραματική Μελέτη ελέγχου των αποτελεσμάτων της βιοπληροφορικής Ανάλυσης.....	56
5.3.1 Έλεγχος αποσιώπησης του HIF-2α.....	57
5.3.2 Ενισχυμένα τμήματα των γονιδίων HJV, SKP2, SEPARIN.....	58
5.3.3 Έκφραση των γονιδίων HJV, SKP2, SEPARIN με αποσιώπηση του HIF-2α στην υποξία.....	59
6. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	62
Βιβλιογραφία.....	65

Περίληψη

Η χαμηλή συγκέντρωση οξυγόνου στα κύτταρα ονομάζεται υποξία και είναι ένα φαινόμενο που συναντάται σε φυσιολογικές και παθολογικές καταστάσεις, όπως ο καρκίνος. Οι κύριοι ρυθμιστές της ομοιόστασης του οξυγόνου είναι οι μεταγραφικοί παράγοντες HIF οι οποίοι μεταβάλλουν την έκφραση πολλών γονιδίων συμβάλλοντας στην προσαρμογή των κυττάρων στην υποξία. Ωστόσο, δεν είναι ακόμη πλήρως γνωστό το πλήθος των γονιδίων που ρυθμίζονται από τους HIF καθώς και ποια ισομορφή είναι υπεύθυνη για τη ρύθμιση αυτών των γονιδίων.

Στην παρούσα διπλωματική επικεντρωθήκαμε στη μελέτη του HIF-2 ο οποίος παρουσιάζει ιστοειδική έκφραση, είναι λιγότερο μελετημένος από τον HIF-1 και αναφέρεται ως ο πιο ενεργά επαγόμενος σε βάθος χρόνου στο ήπαρ και συμβάλει στην πρόοδο και την μετάσταση του καρκίνου ήπατος. Σε προηγούμενη μελέτη της ερευνητικής μας ομάδας, πραγματοποιήθηκε αλληλούχηση RNA σε κύτταρα ηπατοκαρκινώματος Huh7, τα οποία επώαστηκαν σε υποξία με αποσιώπηση του HIF-2α και συλλέχθηκε το μεταγραφομικό τους προφίλ. Στα πλαίσια της παρούσας πτυχιακής ερευνητικής εργασίας αξιοποιήθηκαν τα δεδομένων RNA-seq για την εύρεση πιθανών νέων ρόλων του HIF-2α σε κύτταρα ηπατοκαρκινώματος Huh7 και η ανακάλυψη άγνωστων μέχρι σήμερα γονιδίων που ρυθμίζονται από αυτόν. Αρχικά έγινε η βιοπληροφορική επεξεργασία των RNA-seq δεδομένων με σκοπό την ανάλυση γονιδίων των οποίων η έκφραση ρυθμίζονται θετικά ή αρνητικά από την αποσιώπηση του μεταγραφικού παράγοντα HIF-2α στην υποξία και στη συνέχεια επιλέξαμε να διερευνήσουμε τα γονίδια HJV, SKP2, SEPARIN των οποίων η έκφραση μειώνεται με την αποσιώπηση του μεταγραφικού παράγοντα HIF-2α στην υποξία από τα αποτελέσματα τα βιοπληροφορικής ανάλυσης. Προκειμένου να επιβεβαιωθεί η βιοπληροφορική ανάλυση τα γονίδια αιμοτζουβελίνη (HJV), πρωτεΐνη 2 που σχετίζεται με κινάση φάσης S (SKP2), διαχωριστάση (SEPARIN) μελετήθηκαν και πειραματικά μετά από καλλιέργεια κύτταρα Huh7 με αποσιώπηση του HIF-2α σε συνθήκες υποξίας. Τα αποτελέσματα της RT-qPCR έδειξαν μειωμένη έκφραση των γονιδίων απουσία του HIF-2α σε συνθήκες υποξίας και επιβεβαίωσαν την βιοπληροφορική ανάλυση. Συμπερασματικά, αναδείξαμε για πρώτη φορά ότι τα γονίδια της HJV, SKP2 και SEPARIN επάγονται από τον HIF-2α και διαφαίνεται ότι ο HIF-2α συμμετέχει στην ομοιόσταση του σιδήρου μέσω του HJV και στην ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου μέσω της ρύθμισης των SKP2 και SEPARIN.

Abstract

Low oxygen concentration in cells is a phenomenon called hypoxia and is found in physiological and pathological conditions, such as cancer. The main regulators of oxygen homeostasis are the HIF transcription factors that alter the expression of many genes contributing to the adaptation of cells to hypoxia. However, the whole number of genes regulated by HIFs and which isoform is responsible for regulating these genes is not yet fully known.

In this research we focused on HIF-2 who is characterized by tissue-specific expression, and has been studied less than HIF-1. It is also reported to be the most induced HIF in the liver and contributes to the progression and metastasis in liver cancer. In a previous study by our research group, RNA sequencing was performed on Huh7 hepatocarcinoma cells incubated in hypoxia with siRNA HIF-2 α silencing and their transcriptomic profile was collected. In this thesis, the RNA-seq data were analyzed to find potential novel roles of HIF-2 α in Huh7 hepatocarcinoma cells and to discover previously unknown genes regulated by it.

Initially, transcriptomic analysis of RNA-seq data was performed to find genes whose expression is positively or negatively regulated by silencing of HIF-2 α during hypoxia. In this analysis the expression of HJV, SKP2, SEPARIN genes was evidently decreased during silencing of HIF-2 α in hypoxia. In order to confirm the transcriptomic analysis, the Hemojuvelin (HJV), S-phase kinase-related protein 2 (SKP2), Separin (SEPARIN) gene expression was also evaluated in vitro after culturing Huh7 cells in hypoxia with siRNA silencing of HIF-2 α . The RT-qPCR results indicated decreased gene expression in the absence of HIF-2 α under hypoxic conditions and confirmed the bioinformatic analysis.

In conclusion, we demonstrated for the first time that HJV, SKP2 and SEPARIN genes are induced by HIF-2 α and it is evident that HIF-2 α is involved in iron homeostasis and cell cycle regulation through the regulation of HJV, SKP2 and SEPARIN.

1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Υποξία

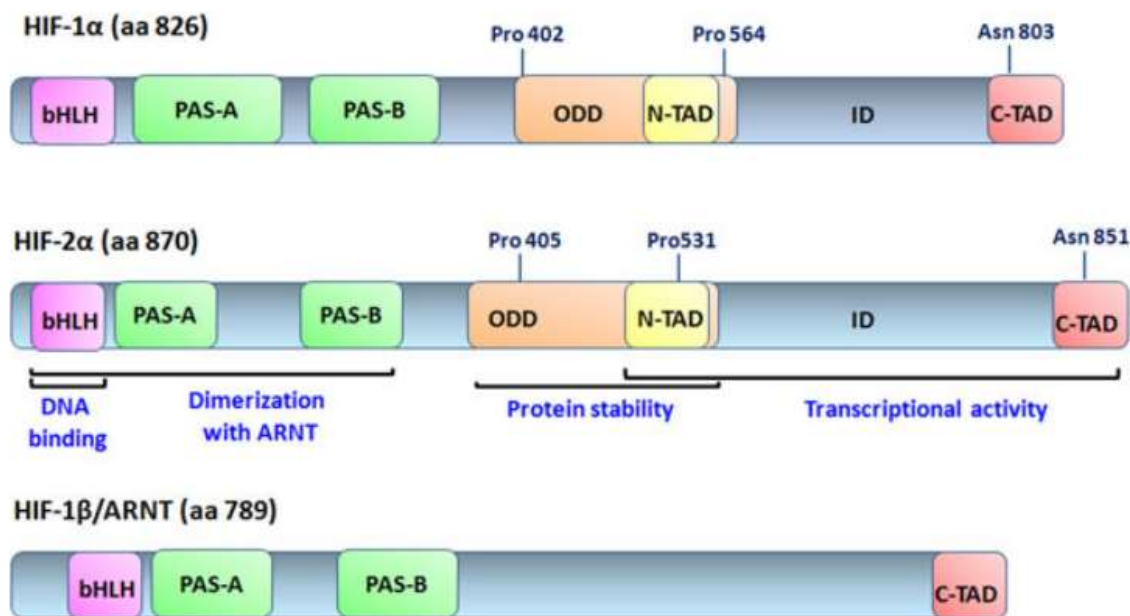
Όλοι οι οργανισμοί πολλές φορές έρχονται αντιμέτωποι με δυσκολίες που διαταράσσουν τις παραμέτρους που επιτρέπουν την ομαλή λειτουργία του οργανισμού. Η υποξία περιγράφεται ως την χαμηλότερη από το φυσιολογικό συγκέντρωση του οξυγόνου στους ιστούς σε συγκέντρωση $<3\%$ [1, 2]. Η συνθήκη της υποξίας συναντάται κατά κύριο λόγο σε εμβρυικά στάδια της ανάπτυξης και κατά την επούλωση πληγών. Για την φυσιολογική λειτουργία των κυττάρων και των κυτταρικών διεργασιών όπως ο κύκλος του Crebs απαιτείται μια ικανοποιητική ποσότητα οξυγόνου ($>5\%$) για τον οργανισμό και όλους του ιστούς [3]. Όταν τα επίπεδα του οξυγόνου πέσουν σε χαμηλότερα επίπεδα δεν μπορεί να πραγματοποιηθεί ο κύκλος του Crebs και άλλοι αερόβιοι μηχανισμοί [2]. Η υποξία παρατηρείται και αποτελεί χαρακτηριστικό παθολογικών καταστάσεων όπως η ισχαιμία και ο καρκίνος. Στο μικροπεριβάλλον του όγκου, τα συνεχώς αναπτυσσόμενα καρκινικά κύτταρα αυξάνουν τις ανάγκες τους για οξυγόνο και θρεπτικά στοιχεία από την κυκλοφορία του αίματος μέσω των αγγείων. Ως απόκριση των κυττάρων στο στρες που δημιουργείται από την υποξία προκαλείται η επαγωγή, η καταστολή και η παραγωγή διαφορετικών ισομορφών γονιδίων με μετα-μεταγραφικές τροποποιήσεις εναλλακτικού ματίσματος [2].

1.2 Μεταγραφικοί παράγοντες HIF

Οι κύριοι ρυθμιστές της ομοιόστασης των κυττάρων που υπόκεινται σε υποξία είναι οι μεταγραφικοί παράγοντες HIFs (Hypoxia Inducible Factors). οι οποίοι αλλάζουν το μεταγραφικό πρότυπο του κυττάρου και βοηθούν στην επιβίωσή του και την προσαρμογή του οξυγόνου.

Οι HIF ανήκουν στην οικογένεια πρωτεϊνών bHLH-PAS, με την χαρακτηριστικό πρωτεϊνικό μοτίβο της έλικας στροφής έλικας και έχουν την ικανότητα σύνδεσης στο DNA. Έχουνε βρεθεί τρεις μεταγραφικοί παράγοντες HIF, ο HIF-1α, ο HIF-2α και ο HIF-3α. Οι τρεις παράγοντες HIF εμφανίζουν κάποια συντηρημένη ομολογία στις επικράτειες αν και οι πιο όμοιοι μεταξύ τους είναι οι HIF-1α και HIF-2α με αμινοξική ομολογία 48%. Ο HIF-3α παρουσιάζει μικρότερη αμινοξική

ομολογία σε σχέση με τις άλλες ισομορφές και συνεπώς θα διαθέτει διαφορετικές κυτταρικές λειτουργίες [4].



Εικόνα 1.1: Οι μεταγραφικοί παράγοντες HIF,

Befani, C.& Liakos, P. (2018). *Journal of Cellular Physiology*. [5]

Είναι διμερή και αποτελούνται κατά κανόνα από την κοινή υπομονάδα ARNT/HIF-1β η οποία είναι σταθερά εκφραζόμενη και την HIF-1α ή HIF-2α ή HIF-3α αντίστοιχα, οι οποίες είναι οξυγονορρυθμιζόμενες [6]. Σε φυσιολογικές συνθήκες οξυγόνου, οι α υπομονάδες των HIF είναι ασταθείς, παράγονται και αποικοδομούνται συνεχώς. Η ρύθμισή τους εξαρτάται από την οικογένεια των υδροξυλασών προλίνης ή PHDs υδροξυλάσες, οι οποίες υδροξυλιώνουν κάποια κατάλοιπα αμινοξέων των HIF, τα οποία στη συνέχεια ουβικουτινώνονται και οι HIF-α οδηγούνται προς αποικοδόμηση στο πρωτεάσωμα σε συνθήκες νορμοξίας ενώ οι HIF-1α, HIF-2α υδροξυλιώνονται και από την FIH που αναστέλλει την μεταγραφική τους δράση.

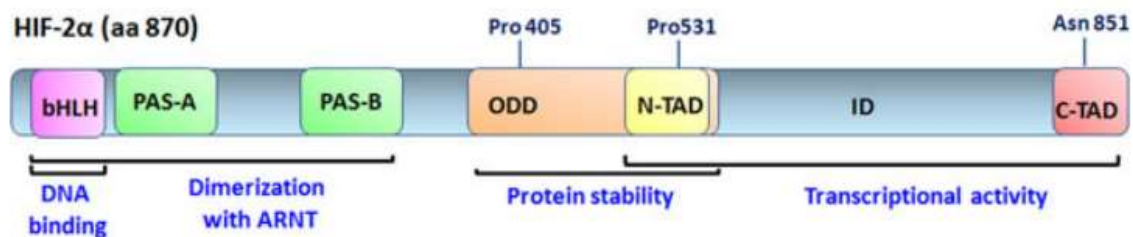
Όταν η συγκέντρωση του οξυγόνου στον ιστό χαμηλώσει (<3%) , οι υπομονάδες HIF-1α, HIF-2α, HIF-3α δεν υδροξυλιώνονται, σταθεροποιούνται, οδηγούνται στον πυρήνα και διμερίζονται με τον ARNT και συνδέονται στους υποκινητές και ρυθμίζουν την έκφραση γονιδίων στόχων τους. Τα γονίδια που επάγουν φέρουν ειδικές αλληλουχίες τα HREs (Hypoxia Responsive elements) 5'-

(A/G)CGTG-3' τις οποίες αναγνωρίζουν και προσδένονται οι HIF. Η ενεργότητα της μεταγραφής τους επηρεάζεται από το ποσοστό του οξυγόνου και είναι μέγιστη στις συνθήκες με τη μικρότερη διαθεσιμότητα οξυγόνου (υποξία 1% O₂) [1]. Στις συνθήκες αυτές οι HIF επάγονται και ρυθμίζουν την έκφραση ενός φάσματος γονιδίων τα οποία θα μεταβάλλουν τις κυτταρικές λειτουργίες οδηγώντας σε μία νέα προσαρμογή των κυττάρων στις συνθήκες υποξίας. Η προσαρμογή αυτή των κυττάρων έχει βρεθεί πως συμμετέχει στην επιθετικότητα του καρκινικού όγκου, την μετάσταση και την διαφοροποίηση [7, 8]. Ακόμη η προσαρμογή αυτή στις χαμηλές συγκεντρώσεις οξυγόνου, συμβάλει στην αποτελεσματική μεταφορά του οξυγόνου και την δημιουργία τοπικά νέων αγγείων [2].

1.3 Ο μεταγραφικός παράγοντας HIF-2α

Το υπεύθυνο γονίδιο που κωδικοποιεί για τον HIF-2α είναι το EPAS1 (endothelial PAS domain protein 1). Ο HIF-2α είναι ιστοειδικός και εκφράζεται σε αρχικά στάδια της ανάπτυξης κατά την δημιουργία και ανάπτυξη των αγγείων και των πνευμόνων αλλά εκφράζεται και καθόλη την διάρκεια της ζωής στο ήπαρ, τον εγκέφαλο, την καρδιά, το πάγκρεας, τους νεφρούς και το έντερο [9]. Ο HIF-2α έχει όμοιες κοινές επικράτειες με τον HIF-1α αλλά η αμινοξική τους ομολογία είναι 48% [5]. Αρχικά αποτελείται από την PAS επικράτεια που είναι υπεύθυνη για τον ετεροδιμερισμό με την ARNT υπομονάδα. Επίσης έχει δύο NLS αλληλουχίες πυρηνικού εντοπισμού μία στο καρβοξυτελικό (C-NLS) και μία στο αμινικό άκρο (N-NLS) και bHLH μοτίβο για την πρόσδεση στο DNA. Η κύρια επικράτεια ρύθμισής του ODD (oxygen dependent domain), είναι οξυγονορυθμιζόμενη. Υδροξυλιώνεται από PHD υδροξυλάσες και έπειτα η VHL την ουβικουιτινώνει και οδηγεί σε πρωτεόλυση τον HIF-2α. Η ρύθμιση της μεταγραφής επιτελείται από δύο επικράτειες που ονομάζονται Επικράτειες Ενεργοποίησης της Μεταγραφής (Transcriptional Activation Domains) και η μία βρίσκεται προς το καρβοξυτελικό C-TAD και η άλλη προς το αμινοτελικό άκρο N-TAD. Είναι υπεύθυνες για την ενεργοποίηση της μεταγραφής καθώς προσελκύουν άλλους μεταγραφικούς συμπαράγοντες και ενεργοποιούν τη μεταγραφή. Αξίζει να σημειωθεί πως οι ειδικοί στόχοι του HIF-2α ενεργοποιούνται από την N-TAD επικράτεια. Ο HIF-2α δρα κυρίως σε γονίδια που εμπλέκονται στην αγγειογένεση όπως τα EPO, VEGF, TIE2, VEGFR2 σε όλα τα στάδια από τον σχηματισμό μέχρι και την σταθεροποίηση των νεοσχηματισμένων τριχοειδών στο ενδοθήλιο των οργάνων που εκφράζεται [5]. Είναι

απαραίτητος για την εμβρυική ανάπτυξη και μοντέλα με απώλεια έκφρασης του HIF-2α που αναπτύχθηκαν απέδειξαν πως η κύηση διακόπτονταν και τα έμβρυα δεν επιβίωναν [2, 10-12]. Επιπροσθέτως, μοντέλα knock-out HIF-2α παρουσίασαν προβλήματα σε ανοσολογικές αποκρίσεις [13]. Στην βιβλιογραφία έχει διαπιστωθεί πως ο κύριος επαγωγέας και ρυθμιστής της ερυθροποιητίνης EPO είναι ο HIF-2α καθώς είναι και ιστοειδικός για τους νεφρούς και το ήπαρ αν και αρχικά θεωρούνταν ο HIF-1α [14]. Παράλληλα είναι από τους κύριους ρυθμιστές της ομοιόστασης σιδήρου και ρυθμίζει γονίδια που εμπλέκονται στον μεταβολισμό του [14, 15]. Επιπροσθέτως, έχει βρεθεί πως με αποσιώπηση του HIF-2α δεν αλλάζει σημαντικά η έκφραση γονιδίων της γλυκόλυσης σε αντίθεση με τον HIF-1α, που δείχνει ότι δεν ρυθμίζει σημαντικά γονίδια της γλυκόλυσης στην υποξία [16, 17]. Μεταλλάξεις του γονιδίου EPAS1 που κωδικοποιεί τον HIF-2α σε συνδυασμό με μεταλλάξεις γονιδίων που οδηγούν στην θετική ρύθμισή του έχουν συσχετιστεί με τον καρκίνο [18]. Ο HIF-2α σχετίζεται με ενδοκρινείς καρκίνους σε ιστούς που εκφράζεται όπως στο ήπαρ και το ηπατοκαρκίνωμα.



Εικόνα 1.2: Ο μεταγραφικός παράγοντας HIF-2α,

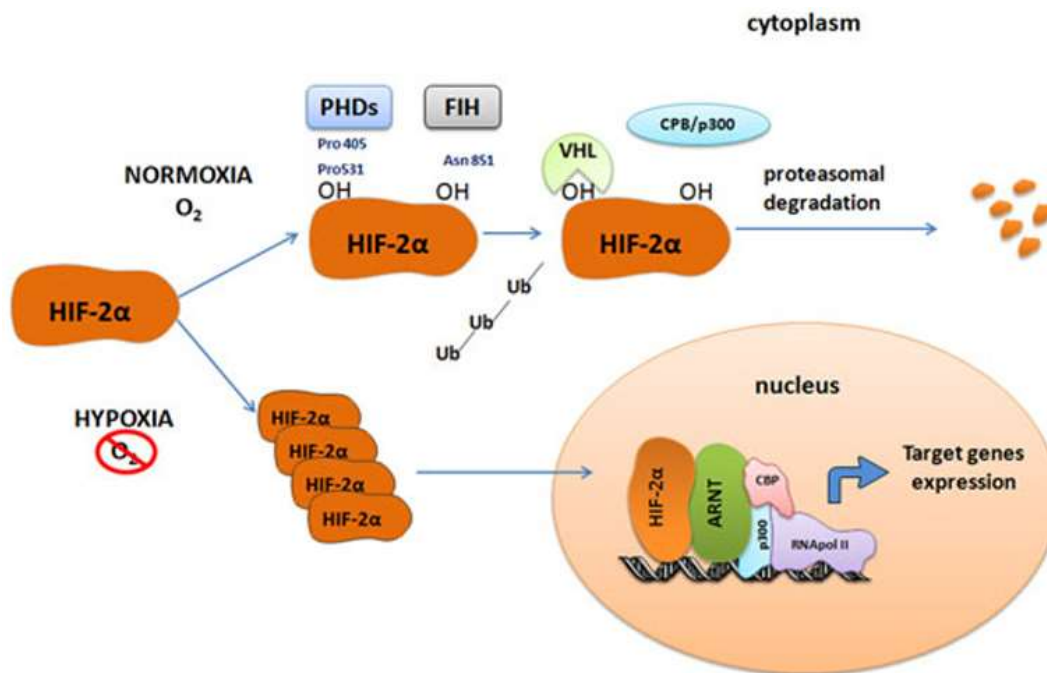
Befani, C.& Liakos, P. (2018). *Journal of Cellular Physiology*. [5]

1.4 Ρύθμιση του HIF-2α

Ο HIF-2α είναι ένας από τους κύριους ρυθμιστές της υποξίας στα όργανα που εκφράζεται ιστοειδικά. Όπως και ο HIF-1α ρυθμίζεται κυρίως από τις συνθήκες του οξυγόνου αλλά και ανεξάρτητα από την οξυγονοεξαρτώμενη ρύθμιση.

1.4.1 Ρύθμιση του HIF-2α από τις συνθήκες οξυγόνου

Σε συνθήκες νορμοξίας, ο HIF-2α υδροξυλιώνεται σε δύο κατάλοιπα προλίνης στην επικράτεια οξυγονορύθμισης ODD από τις PHDs υδροξυλάσες (κυρίως από την PHD2). Πρέπει να τονιστεί ότι οι PHDs υδροξυλάσες που χρησιμοποιούν α-κετογλουταρικό και δισθενή σίδηρο Fe^{2+} ως συμπαραγόντες μπορούν και δρουν στην νορμοξία αλλά όχι στην υποξία [19]. Στην νορμοξία η υδροξυλίωση έχει ως αποτέλεσμα την αναγνώριση από την VHL (Von Hippel Lindau) που οδηγεί σε ουβικουιτίνωση και έπειτα σε αποικοδόμηση στο πρωτεάσωμα. Παράλληλα, ο HIF-2α υδροξυλιώνεται και ρυθμίζεται από τον ανασταλτικό παράγοντα FIH-1 (Factor Inhibiting HIF). Η υδροξυλίωση από την FIH-1 στην N-TAD (σε κατάλοιπο ασπαραγίνης) καταστέλλει την μεταγραφική ενεργότητα του HIF-2α ως έναν άλλο μηχανισμό επιβεβαιωμένης καταστολής του στο κύτταρο. Έρευνες αποδεικνύουν εντονότερη ρύθμιση του HIF-1α μέσω υδροξυλίωσης από τον FIH σε σχέση με τον HIF-2α [20]. Η FIH-1 και οι PHDs δεν είναι ικανές να δράσουν στην υποξία έτσι ο HIF-2α σταθεροποιείται, ενεργοποιείται και είναι ελεύθερος να δράσει.



Εικόνα 1.3: Η ρύθμιση του HIF-2α στην υποξία και νορμοξία μέσω υδροξυλίωσης,

Befani, C., & Liakos, P. *Journal of Cellular Physiology*. [5]

1.4.2 Ρύθμιση του HIF-2α ανεξάρτητα από την παρουσία οξυγόνου

Στην ανεξάρτητη από την παρουσία οξυγόνου ρύθμιση του, ο HIF-2α ρυθμίζεται μέσω μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων και μέσω της αλληλεπίδρασης με άλλες πρωτεΐνες στο κύτταρο.

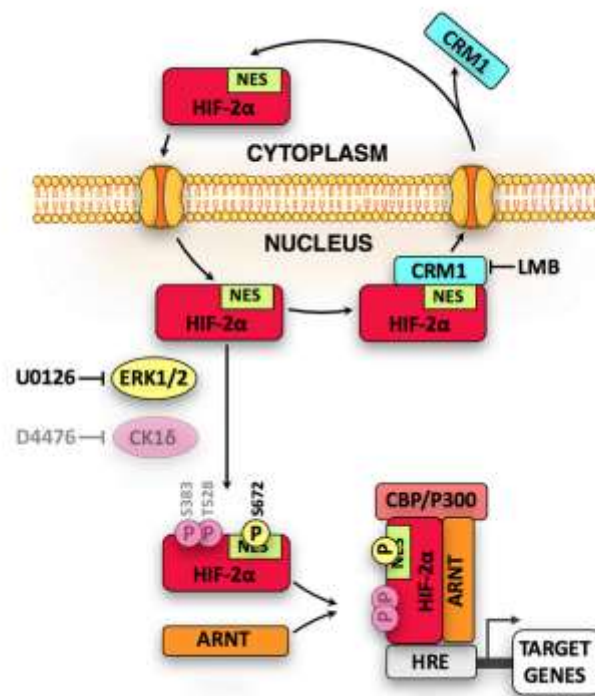
1.4.3 Μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις του HIF-2α

Η ρύθμιση του HIF-2α φυσικά περιλαμβάνει και μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις. Οι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις είναι κοινές για όλες τις πρωτεΐνες ανεξάρτητα από τις πρωτεΐνες που είναι υπεύθυνες για την εισαγωγή των τροποποιήσεων. Πιο ειδικά ο HIF-2α υφίσταται μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις σε πολλά επίπεδα και φωσφορυλιώνεται, ακετυλιώνεται και σουμοϋλιώνεται. Φυσικά η κάθε πρωτεϊνική τροποποίηση που δεν είναι μόνιμη μπορεί να περιλαμβάνει και την αντίθετη διεργασία όπως για παράδειγμα την απακετυλίωση από την αντίστοιχη απακετυλάση.

1.4.3.1 Φωσφορυλίωση του HIF-2α

Η φωσφορυλίωση πρωτεϊνών είναι ίσως η πιο κοινή και συχνή μετα-μεταφραστική τροποποίηση. Σε αυτήν ειδικές πρωτεΐνες που ονομάζονται κινάσες φωσφορυλιώνουν ένα ή παραπάνω αμινοξέα της πρωτεΐνης. Συνήθως τα κατάλοιπα που φωσφορυλιώνονται μπορεί να είναι μια σερίνη, θρεονίνη ή τυροσίνη. Αυτή η διαδικασία είναι αναστρέψιμη και μπορεί να λειτουργήσει ενεργοποιώντας ή απενεργοποιώντας την πρωτεΐνη αλλάζοντας τη δομή της και πολλές φορές συμμετέχει στην μεταγωγή σημάτων μέσα στο κύτταρο.

Η φωσφορυλίωση από τις ERK1/2 είναι ιδιαίτερα σημαντική για την ρύθμιση του HIF-2α, όσον αφορά τον υποκυτταρικό του εντοπισμό και επομένως την δράση του. Οι κινάσες ERK1/2 φωσφορυλιώνουν τον μεταγραφικό παράγοντα HIF-2α στο αμινοξικό κατάλοιπο Ser672, ανάμεσα στις επικράτειες N-TAD και C-TAD. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να μειώνεται η ικανότητα αλληλεπίδρασης της πρωτεΐνης CRM1 με την αμινοξική αλληλουχία του HIF-2α στο μοτίβο NES εξαγωγής από τον πυρήνα [21]. Η ρύθμιση αυτή οδηγεί στην συγκέντρωση του HIF-2α τον πυρήνα και στην ενίσχυση της μεταγραφικής του δραστηριότητας για την μεταβολή του υποξικού προτύπου γονιδιακής έκφρασης.

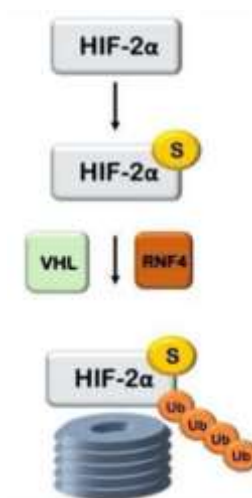


Εικόνα 1.4: Η φωσφορυλίωση του HIF-2 από τις ERK1/2 και CK1δ αναστέλλει την αλληλεπίδρασή του με την CRM1 και οδηγεί στον πυρηνικό του εντοπισμό. Gkotinakou, I.M., et al., Cell Sci, 2019 [21], Pangou, E., et al., Cell Sci, 2016 [22]

Ταυτόχρονα εκτός από τις κινάσες ERK, ο HIF-2α φωσφορυλιώνεται από την Κινάση της καζεΐνης 1δ (CK1δ). Οι κινάσες της καζεΐνης CKs εκφράζονται σε διάφορους κυτταρικούς τύπους συμπεριλαμβανόμενου του ήπατος και συμμετέχουν σε πολλά σηματοδοτικά μονοπάτια. Οι CK διακρίνονται σε δύο κύριες κατηγορίες: τις κινάσες καζεΐνης 1 (CK1) και τις κινάσες καζεΐνης 2 (CK2). Η φωσφορυλίωση του HIF-2α από την CK1δ στα δύο κατάλοιπα Ser-383 και Thr-528, εξασφαλίζει την πυρηνική του συσσώρευση και την μεταγραφική του δραστηριότητα επάγοντας την έκφραση γονιδίων στόχων όπως της EPO σε ηπατοκαρκινικά κύτταρα [22].

1.4.3.2 Σουμοϋλίωση του HIF-2α

Η σουμοϋλίωση συμπεριλαμβάνεται στις μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις πρωτεϊνών και μπορεί να επηρεάσει την ρύθμιση και την σταθερότητα της πρωτεΐνης. Κατά την σουμοϋλίωση γίνεται η προσθήκη μικρού μοριακού βάρους πρωτεϊνών SUMO, σε άλλες πρωτεΐνες. Αυτή η διαδικασία είναι αναστρέψιμη και επηρεάζει ποικίλες κυτταρικές διεργασίες, όπως η μεταγραφή και ο κυτταρικός κύκλος και συχνά συνδέεται με άλλες μεταφραστικές τροποποιήσεις, συνήθως με την ουβικουιτίνωση. Στην περίπτωση του HIF-2α σουμοϋλιώνεται στο κατάλοιπο λυσίνης K394 οδηγεί στην αναγνώριση από τους παράγοντες VHL και RNF4 και σε διαδοχική ουβικουιτίνωση και πρωτεόλυση στο πρωτεάσωμα [23].



Εικόνα 1.5: Η σουμοϋλίωση του HIF-2α οδηγεί στην σύνδεση της VHL και RNF4, σε ουβικουιτίνωση και πρωτεόλυση. Filipporoulou, C., et.al., Cells, 2020 [23]

1.4.3.3 Ακετυλίωση του HIF-2α

Η ακετυλίωση διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης και της επιδιόρθωσης του DNA. Η πρωτεϊνική ακετυλίωση αφορά την τροποποίηση προσθήκης μιας ακετυλικής ομάδας σε ένα κατάλοιπο λυσίνης στην πλευρική της αλυσίδα. Είναι μια σημαντική μετα-μεταφραστική τροποποίηση που ρυθμίζει τη λειτουργία της πρωτεΐνης. Η ακετυλίωση επηρεάζει την αλληλεπίδραση πρωτεϊνών και μπορεί να μεταβάλλει τη σταθερότητά τους.

Στην υποξία ο HIF-2α σταθεροποιείται και η πρωτεΐνη CBP συνδέεται στην C-TAD επικράτεια μεταγραφικής ενεργότητας και οδηγεί στην ακετυλίωση του HIF-2α στο καρβοξυτελικό του άκρο. Η ακετυλίωση προσελκύει ταχέως την απακετυλάση Sirt1 που απακετυλιώνει σε κατάλοιπα λυσίνης κατά μήκος της αμινοξικής αλληλουχίας του HIF-2α και επαναφέρει την συγγένεια του HIF-2 για την CBP, οδηγώντας σε σύνδεση με το σύμπλοκο CBP/p300 γεγονός που μεταβάλλει θετικά την μεταγραφική του ενεργότητα [24, 25].

1.4.4 Ρύθμιση του HIF-2α από την αλληλεπίδρασή του με άλλες πρωτεΐνες

Η ρύθμιση του HIF-2 διαμορφώνεται και από αλληλεπιδράσεις με άλλες πρωτεΐνες που φαίνεται να διαμορφώνουν την ένα ακόμη μέρος ρύθμισης και να επηρεάζουν τα επίπεδα μεταγραφής και μετάφρασής του. Αυτές οι πρωτεΐνες είναι διάφορες και συμπεριλαμβάνουν τον παράγοντα HAF και MYC που οδηγούν μέσω του επαγωγικού τους ρόλου με αλληλεπιδράσεις με άλλες πρωτεΐνες στην συμβολή τους στα επίπεδα μεταγραφής του HIF-2α. Συγκεκριμένα ο HAF μέσω της επαγωγικής του δράσης και την επαγωγή γονιδίων οδηγεί στην ενίσχυση της μεταγραφής του HIF-2α [26].

1.4.4.1 Η αλληλεπίδραση της Ρεπτίνης 52 (Reptin 52) με τον HIF-2α

Η Reptin52 ανήκει στην υπεροικογένεια AAA+ πρωτεϊνών μια ATPάση με διάφορους ρόλους συμμετέχει σε πολλαπλές ανεξάρτητες κυτταρικές λειτουργίες και συναντάται τόσο στον πυρήνα όσο και στο κυτταρόπλασμα [27]. Συγκεκριμένα στη νορμοξία η μεγαλύτερη συγκέντρωση της Reptin52 συναντάται στον πυρήνα, ενώ όταν στο κύτταρο δημιουργείται υποξικό περιβάλλον, φαίνεται να συγκεντρώνεται στον πυρήνα, ομοίως με τον επαγόμενο HIF-2α. Η Reptin52 έχει συνδεθεί με βιολογικές διεργασίες, που μπορεί να εμπλέκονται στην ογκογένεση, όπως η αναδιαμόρφωση της χρωματίνης, η μεταγραφική ρύθμιση, η επιδιόρθωση του DNA, η ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου και ο σχηματισμός της μιτωτικής ατράκτου [27]. Η αλληλεπίδραση του HIF-2α με την πρωτεΐνη Reptin52 αποδείχθηκε πρόσφατα

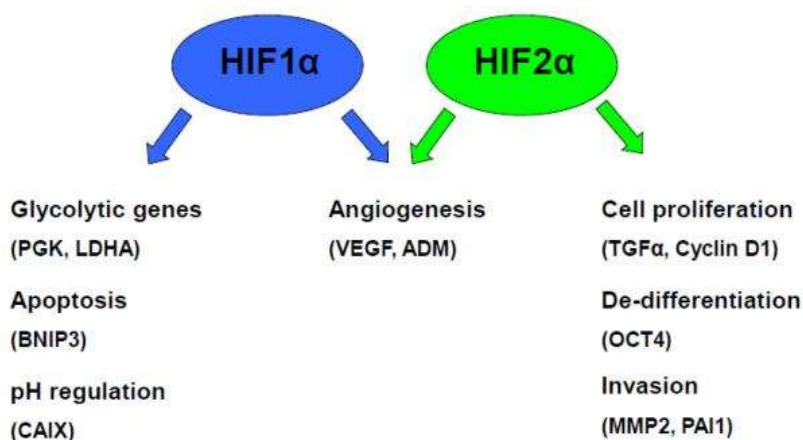
στο εργαστήριο μας με ανοσοκατακρίμνηση και φασματομετρία μάζας. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα η φωσφορυλίωση μέσω των κινασών ERK στην υποξία ευνοεί τη μετατόπισή και αλληλεπίδρασή τους μέσα στον πυρήνα. Η αλληλεπίδραση τους λαμβάνει μέρος εκατέρωθεν της οξυγονορυθμιζόμενης επικράτειας ODD του HIF-2α. Αν και η αλληλεπίδρασή τους σχετίζεται με την ODD επικράτεια, η ρύθμιση που επιφέρει η Reptin52 είναι ανεξάρτητη από την οξυγονοεξαρτώμενη οδό υδροξυλίωσης και αποικοδόμησης του HIF-2α. Η σύνδεση της Reptin52 δρα αρνητικά και προκαλεί αστάθεια του HIF-2α και μειωμένα πρωτεϊνικά επίπεδα. Η αστάθεια του HIF-2α έχει αντίκτυπο και στην αρνητική ρύθμιση της μεταγραφικής ενεργότητας των γονιδίων στόχων που επάγει.

1.4.4.2 Αλληλεπίδραση του HIF-2α με τους ELK1 και ETS1

Ο HIF-2α έχει βρεθεί μέσω ανοσοκατακρίμνησης πως αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη ELK1. Η ELK1 είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας που ανήκει στους TCF παράγοντες (ternary complex factors) της υπερικογένειας ETS μεταγραφικών παραγόντων [28, 29]. Συχνά μεταλλάξεις των ETS παραγόντων συνδέονται με τον καρκίνο και θεωρούνται ογκογονίδια [30]. Ο ELK1 έχει κύριο ρόλο στον εγκέφαλο και την μνήμη και έχει βρεθεί πως υπερεκφράζεται στον καρκίνο του μαστού [31, 32]. Ο ELK1 συμμετέχει στην ενεργοποίηση γονιδίων στόχων του HIF-2α. Σε καρκινικά κύτταρα μαστού (MCF7) αποδείχτηκε ότι με αποσιώπηση του ELK1 στην υποξία μειώνεται η έκφραση του γονιδίου IGFBP3 και αναστέλλεται τελείως η έκφραση των CITED2, WISP2 γονιδίων, που αποτελούν στόχους του HIF-2α και συνεπώς για την ενεργοποίησή τους είναι απαραίτητος και ο ELK1. Στην αλληλουχία του υποκινητή αυτών των γονιδίων βρέθηκε η αλληλουχία HRE σε κοντινή απόσταση με την αλληλουχία πρόσδεσης των ETS παραγόντων [32]. Στην βιβλιογραφία αναφέρεται επίσης πως ο HIF-2 με τον ETS-1, έναν άλλο από τους ETS παράγοντες, ενεργοποιούν το γονίδιο FLK-1 (VEGFR-2) σε ενδοθηλιακά κύτταρα και για την επαγωγή του γονιδίου είναι απαραίτητοι και οι δύο. Και αυτήν την περίπτωση οι αλληλουχίες πρόσδεσης των παραγόντων εντοπίζονται σε κοντινή απόσταση στο γονίδιο [33].

1.5 Γονίδια που επάγονται από τους HIF

Τα γονίδια που ενεργοποιούνται από τους HIF συμμετέχουν σε μία πληθώρα κυτταρικών λειτουργιών και το σύνολο των γονιδίων που επάγονται εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τον κυτταρικό τύπο και κατά συνέπεια τους συνενεργοποιητές της μεταγραφής που βρίσκονται διαθέσιμοι στον συγκεκριμένο ιστό [4]. Κύρια λειτουργία των HIF είναι να επάγουν γονίδια που οδηγούν στην κυτταρική επιβίωση στο χαμηλό οξυγόνο και συνεπώς αυξάνουν την έκφραση γονιδίων του μεταβολισμού και ενζύμων της γλυκόλυσης [14]. Ταυτόχρονα ο HIF-2α επάγει γονίδια αύξησης της διαθεσιμότητας του οξυγόνου στα κύτταρα όπως η EPO και γονίδια που οδηγούν στην αγγειογένεση, τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό (TGfα), την ομοιόσταση ελεύθερων ριζών οξυγόνου, την αναδιαμόρφωση της εξωκυττάριας μήτρας (MMP2, PAI1), τον βλαστικό χαρακτήρα με χαρακτηριστικό παράδειγμα τον OCT4. Συνεπώς, όσον αφορά τα καρκινικά κύτταρα προωθεί, εξαιτίας των επαγόμενων κυτταρικών διεργασιών την μετάσταση [4].



Εικόνα 1.4: Γονίδια που επάγουν οι HIF-1α και HIF-2α,

Pawlus MR I, Hu CJ, Cell Signaling (2013) [34]

1.6 Καρκίνος του ήπατος και HIF-2α

Ο καρκίνος του ήπατος είναι ένας από τους πιο συνηθισμένους τύπους καρκίνου και μάλιστα ο πέμπτος πιο συχνός παγκοσμίως [35]. Στις περιπτώσεις καρκίνου του ήπατος, το μεγαλύτερο ποσοστό του όγκου (90%) αποτελούν κύτταρα Ηπατοκυτταρικού καρκινώματος [35, 36]. Τα άτομα με ηπατοκαρκίνωμα έχουν μεγάλο ποσοστό θνησιμότητας (χρόνος ζωής 6-20 μήνες από την διάγνωση) ενώ προηγουμένως μπορεί να εμφανίζουν κίρρωση του ήπατος και συνήθως είναι προσβεβλημένοι από ηπατίτιδα Β αλλά και να συνοδεύονται από άλλες καταπονήσεις όπως το κάπνισμα και η κατανάλωση αλκοόλ [37].

Το ήπαρ είναι ένα πυκνά αγγειωμένο όργανο με υψηλές παροχές αίματος και συχνά το περιβάλλον του καταλήγει να είναι υποξικό με αποτέλεσμα να επάγονται οι μεταγραφικοί παράγοντες HIF-1α και HIF-2α διαμορφώνοντας ένα προσαρμοζόμενο στην υποξία περιβάλλον [7]. Ο HIF-1 οδηγεί στην έκφραση γονιδίων της γλυκόλυσης (GAPDH, GPI κ.α), της μετανάστευσης και της μετάστασης (SNAIL1, IL-10 κ.α.), του πολλαπλασιασμού και της επιβίωσης (FoxM1, AURKA) [38-41].

Παρόλα αυτά ο επικρατέστερος επαγόμενος HIF στο ήπαρ κατά την μακροχρόνια υποξία είναι ο HIF-2α [42]. Απουσία του HIF-2α στον όγκο έχει συσχετιστεί με μειωμένη ικανότητα προόδου του καρκίνου [8]. Έχει βρεθεί ότι στο ηπατοκαρκίνωμα ο HIF-2α προάγει την αγγειογένεση και επάγει το γονίδιο *Serpine1* [43]. Ταυτόχρονα επάγει το γονίδιο SCF (Stem cell Factor) και συμβάλλει στην μετάσταση ενώ με μειωμένα επίπεδα mRNA του HIF-2α στο ηπατοκαρκίνωμα μειώνεται η έκφραση του SCF και η πιθανότητα μετάστασης σε κύτταρα Huh-7 [44, 45].

Σε κύτταρα HepG2 ο HIF-2α αυξάνει την έκφραση του γονιδίου TGF-α που συμβάλλει στο κυτταρικό πολλαπλασιασμό και του VEGF [46]. Επίσης, ρυθμίζει θετικά την ρύθμιση της κυκλίνης D και σε πειράματα αποσιώπησης του HIF-2α σε κύτταρα HepG2 είχε ως αποτέλεσμα την αναστολή του κυτταρικού κύκλου στην G1 φάση λόγω μειωμένης έκφρασης της Κυκλίνης D1 από τον HIF-2α, ενώ με ταυτόχρονη χορήγηση αντικαρκινικού φαρμάκου δοξορουβικίνης μειώθηκε η πολλαπλασιαστική ικανότητα των καρκινικών κυττάρων [46].

2. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Οι κύριοι ρυθμιστές της ομοιόστασης του οξυγόνου στα κύτταρα είναι οι μεταγραφικοί παράγοντες HIF. Οι HIF μεταβάλλουν την έκφραση πολλών γονιδίων τα οποία σχετίζονται με την αγγειογένεση, την ερυθροποίηση και έχουν στόχο την κυτταρική επιβίωση. Οι πιο καλά μελετημένες ισομορφές των HIF είναι ο HIF-1α και ο HIF-2α οι οποίοι έχουν αρκετά κοινά στοιχεία στην δομή και την ρύθμισή τους ενώ ρυθμίζουν κοινά και διαφορετικά γονίδια. Ωστόσο, δεν είναι ακόμη πλήρως γνωστό το πλήθος των γονιδίων που ρυθμίζονται από τους HIF καθώς και ποια ισομορφή είναι υπεύθυνη για τη ρύθμιση αυτών των γονιδίων.

Ο HIF-2 παρουσιάζει ιστοειδική έκφραση, κυρίως στο ήπαρ, και είναι λιγότερο μελετημένος από τον HIF-1, ως προς τις λειτουργίες του και τα γονίδια που ρυθμίζει. Επιπλέον στην βιβλιογραφία, περιγράφεται ως ο πιο ενεργά επαγόμενος σε βάθος χρόνου στο ήπαρ και συμβάλει στην πρόοδο και την μετάσταση του καρκίνου ήπατος.

Η ερευνητική ομάδα του Εργαστηρίου Βιοχημείας, σε προηγούμενη μελέτη της, πραγματοποίησε αλληλούχηση RNA σε κύτταρα ηπατοκαρκινώματος Huh7, τα οποία επώαστηκαν σε υποξία με αποσιώπηση του HIF-2α και συλλέχθηκε το μεταγραφομικό τους προφίλ. Έτσι σκοπός της εργασίας αυτής είναι η αξιοποίηση προηγούμενων αδημοσίευτων δεδομένων RNA-seq της ερευνητικής μας ομάδας για την εύρεση πιθανών νέων ρόλων του HIF-2α σε κύτταρα ηπατοκαρκινώματος Huh7 και η ανακάλυψη άγνωστων μέχρι σήμερα γονιδίων που ρυθμίζονται από αυτόν.

Για τον σκοπό αυτό η εργασία πραγματοποιήθηκε με δύο κύριες κατευθύνσεις. Η πρώτη αφορά την βιοπληροφορική επεξεργασία των RNA-seq δεδομένων με σκοπό την ανάλυση γονιδίων των οποίων η έκφρασή ρυθμίζονται θετικά ή αρνητικά από την αποσιώπηση του μεταγραφικού παράγοντα HIF-2α στην υποξία. Η δεύτερη κατεύθυνση της εργασίας αφορά την πειραματική μελέτη της έκφρασης επιλεγμένων γονιδίων που στην μεταγραφομική ανάλυση ρυθμίζονται στατιστικά θετικά από τον HIF-2α.

3. ΥΛΙΚΑ-ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΑ

3.1 Προγράμματα

Τα προγράμματα χρησιμοποιήθηκαν για την ανάλυση των δεδομένων RNA-seq και μελετήθηκαν με την κατασκευή διαγραμμάτων volcano plot και έπειτα την ανάλυση οντολογίας και την εξαγωγή ραβδοδιαγραμμάτων.

- MICROSOFT EXCEL (365 ENTERPRISE EDITION)
- PERSEUS (v2.1.2.0)
- ΛΟΓΙΣΜΙΚΟ GENECODIS (GENECODIS 4)

3.2 Κυτταρική σειρά καρκινικών κυττάρων

Huh7: Κύτταρα καρκινικά του ήπατος που απομονώθηκαν από ενήλικο άνδρα μέσης ηλικίας και περιέχουν μετάλλαξη στο p53 γονίδιο, με αποτέλεσμα την παραγωγή μη λειτουργικής πρωτεΐνης [47]. Μορφολογικά παρουσιάζουν χαρακτήρα επιθηλιακό και προσκολλώνται με ευκολία σε κυτταρικά πιάτα. Είναι κύτταρα που χρησιμοποιούνται κυρίως για μελέτες του ιού HCV λόγω μεγαλύτερης αναπαραγωγικής ικανότητας του ιού στα κύτταρα.

3.3 Χημικές ενώσεις- αντιδραστήρια-νουκλεϊκές αλληλουχίες

Τα χημικά αντιδραστήρια-οι χημικές ενώσεις και οι νουκλεϊκές αλληλουχίες (εκκινητές) που αξιοποιήθηκαν για την διεκπεραίωση των πειραμάτων αποκτήθηκαν από τις εταιρίες Sigma (Usa), Applichem (Germany) και Eurofins (Luxemburg).

3.3.1 Εκκινητές που αξιοποιήθηκαν για την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (RT-qPCR)

Οι εκκινητές σχεδιάστηκαν για την αντίδραση αλυσιδωτής πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο και επιλέχθηκαν με στόχο την ενίσχυση τμημάτων 100-120bp για κάθε γονίδιο και με προσοχή ως προς την πιθανότητα δημιουργίας ομοδιμερών και ετεροδιμερών.

HJV	'5 → 3'	GC %	Tm
Forward Primer	GTGTGTAAGGTATGTTCTGCTTTC	42	59
Reverse Primer	GTCCTACCTGTGCCATTCTT	50	57

SKP2	'5 → 3'	GC %	Tm
Forward Primer	GTGTACAGCACATGGACCTATC	50	60
Reverse Primer	CCAGGCTTAGATTCTGCAACT	47	58

SEPARIN	'5 → 3'	GC %	Tm
Forward Primer	GGTAATCTCTGGGATGTGACTG	50	60
Reverse Primer	CGGGCCTGGTTTACATAGTAG	52	60

3.3.2 Αντισώματα

Τα βιολογικά αντισώματα για τις πρωτεΐνες της ανάλυσης σε συνδυασμό με τα δεύτερα αντισώματα της εμφάνισης προμηθεύτηκαν από την εταιρία Cell Signaling (USA).

Προμήθεια	Προέλευση	Αναλογία	Στόχος
Cell Signaling	Ορός κουνελιού	1:1000	HIF-2α
Cell Signaling	Ορός ποντικού	1:750	Tubulin-A
Cell Signaling	Ορός ποντικού	1:3000	Mouse-HRP
Cell Signaling	Ορός κουνελιού	1:5000	Rabbit-HRP

3.3.3 Διαλύματα

Διάλυμα Κυτταρικής Λύσης

Το διάλυμα λύσης χρησιμοποιήθηκε κατά την λύση των κυττάρων, και επέτρεψε την λύση των κυτταρικών μεμβρανών για την μετέπειτα απομόνωση πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων.

ΔΙΑΛΥΜΑ ΛΥΣΗΣ	
<u>ΧΗΜΙΚΟ ΔΙΑΛΥΜΑ</u>	<u>ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ</u>
HCL/ 1M	250mM
NaCl/ 5M	150mM
MgCl ₂ / 1M	5mM
Triton/ 10%	1%
Γλυκερόλη/ 100%	1%
DTT/ 1M	15mM
PMSF/ 100mM	2mM

Διαλύματα πηκτής πολυακρυλαμιδίου με αποδιατακτικές συνθήκες

Παρασκευάστηκαν δύο διαλύματα χωριστά για την δημιουργία της πηκτής ηλεκτροφόρησης. Πρώτα την πηκτική διαχωρισμού, δηλαδή η πηκτική που θα διασχίσουν και θα ηλεκτροφορηθούν για να μελετηθούν οι πρωτεΐνες και έπειτα την πηκτική συσσώρευσης για την ταυτόχρονη φόρτωση και μετάβαση των δειγμάτων προς την πηκτική διαχωρισμού. Παρασκευάστηκαν σύμφωνα με τις συγκεντρώσεις που αναφέρονται στους πίνακες:

Διάλυμα Πηκτής διαχωρισμού

ΠΗΚΤΗ ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΥ	
<u>ΧΗΜΙΚΟ ΔΙΑΛΥΜΑ</u>	<u>ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ</u>
Ακρυλαμίδιο	10%
EDTA	2mM
APS	0.04%
TEMED	0.02%
SDS	0.1%
TRIS	0.375M

Διάλυμα Πηκτής συσσώρευσης

ΠΗΚΤΗ ΣΥΣΣΩΡΕΥΣΗΣ	
<u>ΧΗΜΙΚΟ ΔΙΑΛΥΜΑ</u>	<u>ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ</u>
Ακρυλαμίδιο	4.5%
EDTA	2mM
APS	0.04%
TEMED	0.04%
SDS	0.1%
TRIS	0.125m

Διάλυμα Χρωστικής Ponceau

Η χρωστική που εφαρμόζεται μετά την ηλεκτροφόρηση στην μεμβράνη που φέρει τις πρωτεΐνες και μας επιτρέπει να επιβεβαιώσουμε τις ζωνώσεις των πρωτεϊνών και την επιτυχή ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων. Παρασκευάζεται σύμφωνα με τον πίνακα:

ΔΙΑΛΥΜΑ ΧΡΩΣΤΙΚΗΣ PONCEAU	ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ
ΟΞΙΚΟ ΟΞΥ	1%
ΧΡΩΣΤΙΚΗ PONCEAU	0.5%

Ρυθμιστικό Διάλυμα Ηλεκτροφόρησης σε πηκτή αγαρόζης

Η χρήση του έγινε για την ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων DNA (RT-qPCR) σε πηκτή αγαρόζης 2%

TAE 50X	ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ
TRIS	24.2%
ΟΞΙΚΟ ΟΞΥ	5.71%
EDTA 0.5M	0.05M

Ρυθμιστικό Διάλυμα Ηλεκτροφόρησης σε πηκτή πολυακρυλαμυδίου

Χάρη στο ρυθμιστικό Running Buffer το οποίο χρησιμοποιείται στην συσκευή ηλεκτροφόρησης είναι δυνατή η εφαρμογή του ηλεκτρικού πεδίου και η ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών. Παρασκευάζεται με συγκέντρωση 5x και αραιώνεται για την χρήση του σε τελική συγκέντρωση 1x.

RUNNING BUFFER 5X	ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ
TRIS	50mM
ΓΛΥΚΙΝΗ	1.92mM
SDS	1%

Ρυθμιστικό Διάλυμα PBS

Το ρυθμιστικό διάλυμα PBS χρησίμευσε κατά τις διεργασίες των κυτταρικών καλλιιεργειών.

1. Για την πλύση των κυτταρικών πιάτων τόσο κατά την ανακαλλιέργεια των κυττάρων όσο και κατά την διαδικασία συλλογής τους.

2. Για την μηχανική συλλογή των κυττάρων ως το υγρό μέσο αποκόλλησης και συλλογής τους.

PBS 10X	<u>ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ</u>
NaCl	138mM
KCl	2.67mM
Na₂HPO₄	8.1mM
KH₂PO₄	1.47mM

Ρυθμιστικό Διάλυμα TBS-Tween 20

Το TBST αξιοποιήθηκε για την ανοσοαποτύπωση των πρωτεϊνών στην μεμβράνη έτσι όπως καθορίζεται από την εταιρία προμήθειας των αντισωμάτων. Το διάλυμα αντισωμάτων για την ανοσοαποτύπωση δημιουργήθηκε με την προσθήκη των αντισωμάτων σε ρυθμιστικό διάλυμα TBST. Ταυτόχρονα ρυθμιστικό διάλυμα TBST χρησιμοποιήθηκε μεταξύ των επώσεων των αντισωμάτων για τις πλύσεις της μεμβράνης κατά την πειραματική διαδικασία του Western Blot.

Ρυθμιστικό Διάλυμα TBST

TBST 10X	<u>ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ</u>
TRIS	20mM
NaCl	150mM
TWEEN	0.1%
H₂O	1000ml

Ρυθμιστικό διάλυμα Laemlli

Ρυθμιστικό διάλυμα που εισάγεται στα δείγματα της ηλεκτροφόρησης κατά Western-blot. Είναι χρήσιμο για την σταθεροποίηση του αρνητικού φορτίου των πρωτεϊνών και περιέχει χρωστική που μας επιτρέπει να παρατηρούμε την εξέλιξη της ηλεκτροφόρησης.

LAEMLLI BUFFER	ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ
TRIS	121.14M
SDS	0.07M
ΓΛΥΚΕΡΟΛΗ	10%
2-MΕΡΚΑΠΤΟΑΙΘΑΝΟΛΗ	5%

Ρυθμιστικό Διάλυμα Transfer Buffer

Χρησιμοποιήθηκε κατά την μεταφορά των πρωτεϊνών από την πηκτή σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης. Χωρίς το ρυθμιστικό διάλυμα δεν θα ήταν δυνατή η μεταφορά των πρωτεϊνών και η συλλογική εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου.

Transfer Buffer	ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ
TRIS	125mM
DTT	0.5mM
SDS	0.2%

Διάλυμα χημειοφωταύγειας

Το διάλυμα χημειοφωταύγειας χρησιμοποιήθηκε κατά την εμφάνιση των πρωτεϊνών στην μεμβράνη νιτροκυτταρίνης με την ανάμειξη διαλύματος λουμινόλης και διαλύματος κουμαρικού οξέος.

ΔΙΑΛΥΜΑ ΛΟΥΜΙΝΟΛΗΣ	ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ
TRIS	0.1M
Λουμινόλη	1.25mM

ΔΙΑΛΥΜΑ ΚΟΥΜΑΡΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ	ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ
Κουμαρικό Οξύ	6.8mM
DMSO	100%

4. ΜΕΘΟΔΟΙ

4.1 ΜΕΤΑΓΡΑΦΟΜΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

4.1.1 Στατιστική επεξεργασία δεδομένων *RNA-seq*

Τα δεδομένα που αναλύθηκαν αφορούν RNA-sequencing δεδομένα ανάγνωσης ώριμων μεταγράφων κυττάρων σε δύο διαφορετικές συνθήκες. Την μία συνθήκη υποξίας και μία συνθήκη κυττάρων σε υποξία με την χρήση si-RNA και αποσιώπηση του μεταγραφικού παράγοντα HIF-2α. Για την στατιστική επεξεργασία των δεδομένων χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα excel στο οποίο έγιναν οι υπολογισμοί με τις κατάλληλες μαθηματικές συναρτήσεις και λειτουργίες του λογισμικού Excel Microsoft Corp. . Ως p-value ορίστηκε η EdgeR_p-value με κατώτατο όριο στατιστικής σημαντικότητας το 0.05%. Παράλληλα τα γονίδια τα οποία σημάνθηκαν στην ανάλυση συνδέονται με αλλαγή κατά 75% στην έκφρασή τους μεταξύ των δύο συνθηκών.

4.1.2 Δημιουργία οπτικών γραφημάτων ανάλυσης

Η γραφική απεικόνιση των γονιδίων με βάση την στατιστική ανάλυσή στο volcano plot έγινε επιτυχής με την βοήθεια του προγράμματος Perseus (Max Planck institute of Biochemistry Software). Πραγματοποιήθηκε εισαγωγή των δεδομένων της στατιστικής ανάλυσης και το διάγραμμα αναπαρίσταται με τις παραμέτρους της στατιστικής ανάλυσης που διεξήχθη στο πρόγραμμα excel.

4.1.3 Ανάλυση Οντολογίας

Στην συνέχεια τα γονίδια που βρέθηκαν στην ανάλυση ως στατιστικά σημαντικά, με επιπλέον αλλαγή στην έκφρασή τους τουλάχιστον κατά 75% και άνω μεταξύ των συνθηκών προχωρήσαν να εξεταστούν στην ανάλυση οντολογίας. Το πρόγραμμα ελεύθερου ιστού GeneCodis χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση οντολογίας. Στα αποτελέσματα αναπαρίστανται οι πρώτες 15 πιο σημαντικές αντιστοιχίσεις ενώ οι αναλύσεις έγιναν χωριστά για τα γονίδια που μειώνεται η έκφρασή τους στατιστικά και έπειτα για τα γονίδια που αυξάνεται η έκφρασή τους στατιστικά. Η

ανάλυση έγινε για τα Kegg μονοπάτια, μονοπάτια go BP, μονοπάτια Reactome , και Panther. Αυτά αποτελούν βάσεις δεδομένων που μας επιτρέπουν να συνδέουμε γονίδια με κυτταρικά μονοπάτια που εμπλέκονται και αλληλεπιδρούν.

4.2 ΜΕΘΟΔΟΙ ΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ ΠΕΙΡΑΜΑΤΩΝ

4.2.1 Καλλιέργεια κυτταρικής σειράς Huh7

Τα κύτταρα μέσα στο διάλυμα κρύο-συντήρησης (Freezing medium 10% DMSO, FBS) διατηρούνται σε υγρό άζωτο (-196°C) σε ειδικά φιαλίδια. Επομένως, προκειμένου αρχικά να ξεπαγώσουμε τα κύτταρα, παίρνουμε τα φιαλίδια των κυττάρων από το υγρό άζωτο και τα τοποθετούμε σε υδατόλουτρο τους 37°C με χειροκίνητη ανάδευση έως ότου ξεπαγώσουν πλήρως. Η καλλιέργεια των κυττάρων έγινε σε κυτταρικό πιάτο με την προσθήκη θρεπτικού μέσου Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM 10% βόειου ορού FBS και 1% αντιβιοτικών πενικιλίνη στρεπτομυκίνη) +/-με πλαστική πιπέτα υπό αποστειρωμένες συνθήκες στον απαγωγό νηματικής ροής. Στη συνέχεια ακολούθησε η ανανέωση του θρεπτικού 3 φορές σε χρονικό διάστημα 8 ημερών μέχρι την αρχική ανακαλλιέργεια.

4.2.2 Ανακαλλιέργεια-μεταφορά αναπτυσσόμενων κυττάρων σε νέα πιάτα

Η διενέργειες ανακαλλιέργειας των κυτταρικών καλλιεργειών διεξήχθησαν καθόλη την διάρκειά στον θάλαμο νηματικής ροής. Αρχικά αφαιρείτε το θρεπτικό μέσο και ακολουθεί στην συνέχεια πλύση των κυττάρων με PBS σε θερμοκρασία δωματίου, 2 φορές. Έπειτα προστίθεται 1ml θρυψίνης η οποία βοηθά την πέψη πρωτεϊνών προσκόλλησης, για 5min στον επωαστήρα στους 37 °C με σκοπό την αποκόλληση των κυττάρων από την βάση του πιάτου. Αφού γίνει με την πιπέτα ήπια ανακίνηση των κυττάρων προστίθενται 4ml θρεπτικού μέσου DMEM για να σταματήσει η αντίδραση της θρυψίνης. Ακολούθησε καταμέτρησης των κυττάρων και στη συνέχεια την μεταφορά του επιθυμητού αριθμού κυττάρων με τον υπολογισμένο όγκο πυκνότητας κυττάρων σε νέο πιάτο με DMEM +/- . Για την καταμέτρηση των κυττάρων

χρησιμοποιούνται 10μl από το εναιώρημα κυττάρων (των 5 ml). Για τη διενέργεια του πειράματος αποσιώπησης τα κύτταρα καλλιεργούνται σε συγκέντρωση 125.000 κύτταρα/ml θρεπτικού. Τοποθετούνται σε τριβλίο καλλιέργειας με τελικό όγκο 5ml (οι αριθμοί των όγκων είναι αντικείμενο προσαρμογής ανάλογα με την διάμετρο του πιάτου και μπορεί να είναι 4ml DMEM ή μικρότεροι π.χ. 2.5ml DMEM). Η ανακαλλιέργεια των κυττάρων λαμβάνει μέρος κάθε περίπου 3 ημέρες με τελική πυκνότητα 80-90%.

4.2.3 Αποσιώπηση του HIF-2α σε κύτταρα Huh7 με χρήση si-RNA

Για την προετοιμασία του διαλύματος αποσιώπησης γίνεται χωριστά η προσθήκη του siRNA (2.5ul siHIF2α, 1ul siCTRL) σε 50ul Optimem και χωριστά η προσθήκη Lipofectamine 2000 2.5ul σε 50ul διαλύματος Optimem. Ακολουθεί επώαση για 5 λεπτά και έπειτα ενώνουμε τα διαλύματα με Lipofectamine και siRNA και επωάζουμε για 20 λεπτά. Όσον αφορά τα κύτταρα πρώτα αφαιρείται το θρεπτικό μέσο. Ακολουθούν 2 πλύσεις με PBS και η προσθήκη 1.4ul θρεπτικού μέσου χωρίς αντιβιοτικό DMEM +/- . Το διάλυμα αποσιώπησης προστίθεται στα κύτταρα. Αφού περάσουν 4 ώρες αλλάζεται το θρεπτικό μέσο σε πλήρες DMEM +/+. Η αποσιώπηση διαρκεί για 24 και μετά τα κύτταρα εισάχθηκαν σε συνθήκες υποξίας ή παρέμειναν σε νορμοξία.

4.2.4 Επώαση κυττάρων σε υποξία

Για την ανάπτυξη των κυττάρων σε υποξία μεταφέρονται σε κατάλληλο θάλαμο που προσφέρει τις συνθήκες συγκέντρωσης οξυγόνου, διοξειδίου του άνθρακα και ενυδάτωσης με υγρασία. Τα κύτταρα αναπτύχθηκαν στις συνθήκες υποξίας που προσφέρει ο θάλαμος IN VIVO2 200 μοριακού οξυγόνου (O₂) 1% και διοξείδιο του άνθρακα (CO₂) 5%. Η επώαση διήρκεσε 16 ώρες αμέσως μετά την διαμόλυνση με si-RNA έναντι του HIF-2α και πριν την συλλογή των κυττάρων.

4.2.5 Απομόνωση κυτταρικών εκχυλισμάτων

Τα κύτταρα εξάγονται από τον επωαστήρα και τον υποξικό θάλαμο. Αφαιρείται το θρεπτικό και γίνονται 2 πλύσεις με κρύο PBS 1X. Τα κύτταρα συλλέγονται σε 1ml διαλύματος PBS 1X απευθείας από το πιάτο με μηχανική αποκόλλησή από τον πυθμένα του πιάτου. Το 1ml=1000ul του κυτταρικού εναιωρήματος μεταφέρεται σε δοχείο erpedorf και στην συνέχεια θα χωριστεί. 750ul από το συνολικό εναιώρημα θα αποθηκευτούν στον πάγο για την απομόνωση του ολικού RNA αμέσως μετά. Από τα 1.000ul, 250ul θα μεταφερθούν σε νέο erpedorf και χρησιμοποιούνται για την απομόνωση των κυτταρικών πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων και φυγοκεντρούνται για 5 λεπτά σε 13.300rpm για την καθίζηση του εναιωρήματος των κυττάρων σε ένα ενιαίο ίζημα και την λύση των κυττάρων. Μετά την αφαίρεση του υπερκείμενου υγρού προστίθενται 40ul διάλυμα λύσης για την ολική λύση των κυτταρικών μεμβρανών και πραγματοποιείται επώαση στον πάγο για 15 λεπτά, με ενδιάμεση ανάδευση στο Vortex. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 13.300rpm για 15 λεπτά στους 4°C για την τελική απομόνωση των πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων.

4.2.6 Ποσοτικοποίηση πρωτεϊνών με αντιδραστήριο Bradford

Το ενδιάμεσο βήμα πριν την ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών είναι η ποσοτικοποίηση τους σε κάθε δείγμα για την εξασφαλισμένη ισοφόρτωση τους στην πηκτή και την ομοιογένεια των αποτελεσμάτων οπτικοποίησης. Μια από τις πιο εύκολες και αξιόπιστες μεθόδους αποτελεί η Bradford που στηρίζεται στο αντιδραστήριο της χρωστικής Coomassie Brilliant Blue-R250 η οποία σε όξινο διάλυμα συνδέεται με τις πρωτεΐνες και το σύμπλοκο παρουσιάζει απορρόφηση στο φάσμα των 595nm. Για την διαδικασία ποσοτικοποίησης έγινε η προσθήκη 5ul διαλύματος εκχυλίσματος πρωτεϊνών σε 95ul H₂O σε erpedorf. Στην συνέχεια προσθέτουμε 1ml διαλύματος Bradford και μετά από ήπια ανάδευση τοποθετούμε στο σκοτάδι για 10 λεπτά επώαση. Η φωτομέτρηση πραγματοποιήθηκε στα 595nm. Η καταμέτρηση του πρωτεϊνικού φορτίου βασίζεται στην προσέγγιση της πρότυπης καμπύλης αναφοράς μέτρησης πρότυπου διαλύματος γνωστών συγκεντρώσεων της πρωτεΐνης αλβουμίνης και την χρήση της εξίσωσης της καμπύλης, εφόσον οι τιμές απορρόφησης συμπίπτουν στα όρια της πρότυπης καμπύλης.

4.2.7 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνικού εκχυλίσματος σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου-SDS σε αποδιατακτικές συνθήκες

Η ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου ανήκει στις κυριότερες τεχνικές ανάλυσης της βιοχημείας και της μοριακής βιολογίας. Οδηγεί στον διαχωρισμό πρωτεϊνών με βάση το μοριακό τους βάρος για την μετέπειτα ανάλυσή τους με σκοπό την ανάγνωση της σύστασης του πρωτεϊνικού εκχυλίσματος, της αναγνώρισης πρωτεϊνών ή πρωτεϊνικών συμπλοκών και συνδυάζεται με τις τεχνικές της ανοσοαποτύπωσης και της ανοσοκατακρίμνησης που ακολουθούν μετά την ηλεκτροφόρηση. Βασίζεται στον ανιονικό-δραστικό παράγοντα SDS (Sodium Dodecyl Sulfate) που απενεργοποιεί ενδομοριακές αλληλεπιδράσεις και αναθέτει ένα ομοιογενές αρνητικό φορτίο στις πρωτεΐνες το οποίο είναι ανάλογο του μεγέθους τους. Η ταχύτητα κίνησης των πρωτεϊνών στην πηκτή καθορίζεται από το φορτίο των πρωτεϊνών που είναι ανάλογο του μεγέθους τους και οδηγεί τις μικρότερες πρωτεΐνες να διασχίζουν γρηγορότερα την πηκτή από τις μεγαλύτερου μοριακού βάρους πρωτεΐνες. Επίσης η ταχύτητα κίνησης των πρωτεϊνών εξαρτάται άμεσα από την συγκέντρωση του πολυακρυλαμιδίου. Το ακρυλαμίδιο καθιστά το πλέγμα μέσα στο οποίο «τρέχουν» οι πρωτεΐνες όσο μεγαλύτερη είναι η συγκέντρωσή του τόσο μικρότεροι είναι οι πόροι της πηκτής και οι πρωτεΐνες χρειάζονται περισσότερο χρόνο για να το διασχίσουν. Και το μέγεθος της έντασης του ηλεκτρικού πεδίου που θέτουμε επηρεάζει την κίνηση των πρωτεϊνών και διανέμεται σε όλη την συσκευή μέσω του ενδιάμεσου ρυθμιστικού διαλύματος running buffer επηρεάζει. Οι πρωτεΐνες για να αρχίσουν να διαχωρίζονται πρέπει πρώτα να περάσουν από τον πρώτο μέρος της πηκτής συσσώρευσης που επιτρέπει την μαζική συσσώρευση και την ταυτόχρονη έναρξη της διαδρομής τους στην πηκτή διαχωρισμού όπου θα κατανεμηθούν με βάση το φορτίο τους και θα είναι η τελική τους θέση που θα γίνει η ανάλυση ανάλογα με το μοριακό βάρος τους. Ταυτόχρονα με τα δείγματα ενσωματώθηκε χωριστά και διάλυμα μάρτυρα πρωτεϊνών γνωστού μοριακού βάρους σημασμένες με χρωστική για την αναγνώριση των ζωνών μοριακών βαρών πάνω στην πηκτή. Πειραματικά για την ηλεκτροφόρηση χρησιμοποιήθηκε συσκευή Hoeffer. Πρώτα προστέθηκε ρυθμιστικό διάλυμα χρωστικής 4X LAEMMLI και DTT στα δείγματα πρωτεϊνικού εκχυλίσματος και επωάστηκαν στους 95°C για 5 λεπτά. Ακολούθησε η παρασκευή των διαλυμάτων πηκτών, για την πηκτή διαχωρισμού και της συσσώρευσης και αφού στερεοποιήθηκε η πηκτή, τα δείγματα με όγκο 20ul και ο μάρτυρας φορτώθηκαν και εφαρμόστηκε ρεύμα συνεχούς τάσης στα 120Volts για ένα χρονικό διάστημα που επέτρεψε τον διαχωρισμό και την διαυγή κατανομή του μάρτυρα σε ζώνες.

4.2.8 Μεταφορά πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης

Το ενδιαμέσο βήμα πριν την ανοσοαποτύπωση κατά Western-blot για τις πρωτεΐνες είναι η μεταφορά τους σε ένα μέσο άλλου της πηκτής. Η πρακτική της χρήσης την καθιστά ευαίσθητη και επιρρεπή και επιτρέπει την πιθανή μετακίνηση των πρωτεϊνών. Επομένως χρειάζεται ένα καλύτερο μέσο ανάλυσης των πρωτεϊνών που είναι λιγότερο εύθραυστο και επιτρέπει την μεταφορά των πρωτεϊνών σε αυτό από την πηκτή. Συνήθως χρησιμοποιείται μία μεμβράνη που είναι υδρόφοβη και στα πλαίσια του πειράματος μία μεμβράνη νιτροκυτταρίνης. Η μεμβράνη επιτρέπει την πρόσδεση ειδικών αντισωμάτων για την ανίχνευση των πρωτεϊνών. Η μεταφορά γίνεται δυνατή ομοίως με την ηλεκτροφόρηση με την εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου στην συσκευή (Biorad) και την διήθηση σε ρυθμιστικό διάλυμα.

Αρχικά η πηκτή και η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης εμβαπτίζεται σε ρυθμιστικό διάλυμα που επιτρέπει την μεταφορά Transfer Buffer 1X και παραμένει ενυδατωμένη. Η συσκευή που χρησιμοποιήθηκε επιτρέπει την semidry-ημιενυδατωμένη μεταφορά. Για την μεταφορά από την πηκτή στην μεμβράνη χτίζεται ένα σύνολο στρώσεων μεμβρανών και της πηκτής. Πρωτίστως πάνω από τον θετικό πόλο τοποθετούνται 3 στρώσεις διηθητικής μεμβράνης Whatman ενώ πάνω τοποθετείται η μεμβράνη και η πηκτή που θα επιτρέψει την μεταφορά των πρωτεϊνών από την πηκτή προς την μεμβράνη. Η κατασκευή ασφαρίζεται με την προσθήκη πάνω από την πηκτή άλλων τριών μεμβρανών Whatman οι οποίες προστίθεται μία προς μία. Αξίζει να σημειωθεί ότι όλες οι μεμβράνες εμβαπτίζονται σε ρυθμιστικό διάλυμα πριν την εισαγωγή τους. Η μεταφορά των πρωτεϊνών έγινε με την συμβολή ηλεκτρικού ρεύματος στην μεμβρανική κατασκευή με συνεχή ένταση 80mA για 1 ώρα και 15 λεπτά.

4.2.9 Ανοσοαποτύπωση κατά Western Blot

Μετά την απόκτηση της μεμβράνης με τις πρωτεΐνες ενσωματωμένες πάνω της, έγινε χρώση της μεμβράνης σε χρωστική Ponceau S που επέτρεψε την αρχική οπτικοποίηση της επιτυχούς μεταφοράς τους. Στη συνέχεια εκτελέστηκε μία πλύση της μεμβράνης με υπερκάθαρο αποιονισμένο διάλυμα H₂O και κατόπιν η μεμβράνη τοποθετήθηκε με διάλυμα γάλακτος 5% TBS-0,1%Tween και επώαστηκε για 1 ώρα υπό ανάδευση, γεγονός που επιτρέπει την συμπλοκοποίηση

των μη ειδικών θέσεων των πρωτεϊνών με αντισώματα και την εξασφάλιση σημάτων για τα ειδικά αντισώματα στη συνέχεια. Ακολούθησε η πλύση της μεμβράνης με TBS-0,1% για 15 λεπτά ώστε να αφαιρεθούν υπολείμματα του διαλύματος γάλακτος και των αντισωμάτων. Έστερα διενεργήθηκε η επώαση της μεμβράνης με αντισώματα ειδικά έναντι του HIF-2α και της τουμπουλίνης με διάλυμα TBS-0,1% 5% γάλακτος και επώαστηκε ολονύχτια υπό ανάδευση στους 4 βαθμούς κελσίου. Έπειτα, έγινε αφαίρεση του διαλύματος αντισωμάτων από την μεμβράνη και πραγματοποιήθηκαν 3 πλύσεις της μεμβράνης, για 5 λεπτά η κάθε πλύση, με TBS-0,1%. Τέλος η μεμβράνη επώαστηκε με αντισώματα στόχευσης για τα πρώτα αντισώματα anti-Rabbit και anti-Mouse που φέρουν το ένζυμο αντίχνευσης την υπεροξειδάση, για 1 ώρα. Μετά την επώαση πραγματοποιήθηκαν 3 πλύσεις για 5 λεπτά με TBS-0,1% 5% γάλα για την αφαίρεση περίσσειας αντισωμάτων και τον καθαρισμό πριν την οπτικοποίηση.

4.2.10 Μέτρηση χημειοφωταύγειας λουμινόλης

Η ποσοτικοποίηση είναι εφικτή μέσω της εκπομπής χημειοφωταύγειας της υπεροξειδάσης με την εισαγωγή του υποστρώματος. Έτσι παρασκευάστηκε διάλυμα λουμινόλης με την προσθήκη υπεροξειδίου του υδρογόνου H_2O_2 και κουμαρικού οξέος). Το διάλυμα προστέθηκε στην μεμβράνη και επώαστηκε για 2 λεπτά πριν την ακόλουθη μέτρηση. Η μέτρηση πραγματοποιήθηκε στο πρόγραμμα UVItch στην συσκευή Uvitech Imager Cambridge.

4.2.11 Απομόνωση ολικού RNA

Από τα 1000ul του κυτταρικού λύματος 750ul αξιοποιήθηκαν στην απομόνωση του ολικού RNA. Τα V=750ul κυτταρικού εναιωρήματος εισήχθησαν σε φυγοκέντρηση στα 13.300 rpm για λίγα λεπτά με σκοπό την δημιουργία κυτταρικού ιζήματος και στην συνέχεια την απομάκρυνση του υπερκειμένου. Κατόπιν πραγματοποιήθηκε η προσθήκη 300ul αντιδραστηρίου NucleoZOL και ανάδευση με το ακροφύσιο της μικροπιπέτας με σκοπό την ομογενοποίηση των κυττάρων. Με την ολοκλήρωση της ομογενοποίησης εισήχθησαν 160ul υπερκάθαρου H_2O απουσία ριβονουκλεασών και το διάλυμα επώαστηκε σε θερμοκρασία δωματίου 25°C για 10 λεπτά. Στη συνέχεια έγινε φυγοκέντρηση στα 12.000g για 15 λεπτά στους 4°C για την κλαματοποίηση του RNA στην ανώτερη ζώνη και των άλλων μορίων στις κατώτερες. Από το κλάσμα του RNA, 500ul

μεταφέρθηκαν σε νέο erpendorf, και προστέθηκε ισοπροπανόλη ίσου όγκου 500ul με σκοπό την ιζηματοποίηση του RNA και επωάστηκε για 10 λεπτά. Έπειτα πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρωση στα 12.000g για 15 λεπτά στους 4°C. Αρχικά αφαιρέθηκε η πλειονότητα του υπερκείμενου υγρού με μικροπιπέτα και προστέθηκε στο erpendorf 500ul διαλύματος αιθανόλης 75% για πλύση του RNA. Το διάλυμα φυγοκεντρήθηκε για 3 λεπτά στα 8000g στους 4°C. Η προσθήκη της αιθανόλης και η φυγοκέντρωση επαναλήφθηκαν μία ακόμα φορά με σκοπό την ολική αφαίρεση της ισοπροπανόλης με την αιθανόλη. Στο τέλος το υπερκείμενο απορρίφθηκε και τα erpendorf παρέμειναν στον πάγκο σε οριζόντια κλίση για την τελική εξάτμιση της εναπομείνουσας αιθανόλης για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Τέλος τα ίζημα που αποτελεί το απομονωμένο RNA επαναδιαλυτοποιήθηκε σε 20ul υπερκάθαρο νερό απουσία ριβονουκλεασών και ακολούθησε σύντομο Vortex για την ομογενοποίηση του διαλύματος. Τα δείγματα του ολικού RNA μεταφέρθηκαν και αποθηκεύτηκαν σε βαθιά κατάψυξη στην θερμοκρασία των -80°C.

4.2.12 Σύνθεση cDNA

Για την ενίσχυση τμημάτων των μεταγράφων των γονιδίων που επιλέχθηκαν για την μελέτη των επιπέδων έκφρασης μέσω της πραγματικού χρόνου PCR πρωτίστως έπρεπε να γίνει η σύνθεση cDNA από τα ώριμα mRNA, αξιοποιώντας ως μήτρα το ολικό RNA που απομονώσαμε από τα κύτταρα κάθε συνθήκης. Το στάδιο αυτό είναι απαραίτητο για να έχουμε DNA ως το υπόστρωμα στην αντίδραση PCR πάνω στο οποίο μπορεί να προσδεθεί και να δράσει η DNA πολυμεράση. Η σύνθεση του cDNA αποτελεί μία παραλλαγή της αντίδρασης PCR η οποία είναι διαφορετικά προσαρμοσμένη για την παρασκευή cDNA με RNA ως υπόστρωμα και όχι την εκθετική ενίσχυση τμημάτων DNA. Στην παρούσα πτυχιακή χρησιμοποιήθηκε το kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied biosystems).

Συνεπώς, πραγματοποιήθηκε ξεπάγωμα του RNA των κυττάρων και αφού υγροποιήθηκε πλήρως ποσοτικοποιήθηκε στην συσκευή NanoDrop. Το κάθε δείγμα δέχτηκε την προσθήκη της κατάλληλης ποσότητας H₂O με σκοπό τελική συγκέντρωση κοντά στο 1μg/10ul. Κατόπιν, με την χρήση μικροπιπέτας 1ul από το ολικό RNA για κάθε δείγμα αραιώθηκε σε 9ul καθαρό H₂O σε νέα erpendorf. Έπειτα πραγματοποιήθηκε προσθήκη 10ul διαλύματος RT mix. Παράλληλα παρασκευάστηκε δείγμα αρνητικού ελέγχου χωρίς αντίστροφη μεταγραφάση (NRT) και αρνητικό

δείγμα απουσίας υποστρώματος (NTC) με την προσθήκη H₂O για τελικό όγκο 20ul. Το διάλυμα RT mix περιέχει όλα τα απαραίτητα συστατικά για να πάρει μέρος η αντίδραση. Η αντίδραση βασίζεται στο ένζυμο αντίστροφη μεταγραφάση (Reverse Transcriptase) που δρα με την βοήθεια του μείγματος εκκινητών oligo-dT και τυχαίων, οι οποίοι υβριδίζουν πάνω στα ώριμα μετάγραφα mRNA από το σύνολο των μορίων RNA στο δείγμα μας. Για να δράσει εξασφαλίζουμε τις βέλτιστες συνθήκες pH με αντίστοιχο ρυθμιστικό διάλυμα της μεταγραφάσης και θερμοκρασίας εισάγοντας τις παραμέτρους στον θερμοκυκλοποιητή μας: 1. 10 λεπτά στους 25°C 2. 120 λεπτά στους 37°C (η αντίδραση της αντίστροφης μεταγραφής λαμβάνει μέρος) 3. 5 λεπτά στους 85°C (απενεργοποίηση RT) 4. Παράταση ψύξης 4 °C μέχρι την παραλαβή των δειγμάτων. Στο τέλος το cDNA για την μακροχρόνια συντήρησή του μεταφέρθηκε στους -20 °C μέχρι την πραγματοποίηση της RT-PCR.

<u>ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΟ</u>	<u>ΟΓΚΟΣ (μl)</u>
H ₂ O	4.2
RT Buffer (10X)	2
dNTPS	0.8
RT Random Primers (10X)	2
RNA	10
Reverse Transcriptase	1
ΣΥΝΟΛΟ	20

Πίνακας 4.1

4.2.13 Αντίδραση αλυσιδωτής πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (RT-qPCR)

Η Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (RT-PCR) αποτελεί την κυριότερη παραλλαγή της πιο ευρέως εφαρμοσμένης τεχνικής που χρησιμοποιείται στη μοριακή βιολογία

της PCR. Μας επιτρέπει , τη μελέτη των επιπέδων γονιδιακής έκφρασης μέσω της ενίσχυσης και ποσοτικοποίησης ειδικών αλληλουχιών DNA. Η στοχευμένη ενίσχυση βασίζεται στην χρήση συμπληρωματικών εκκινητών που υβριδίζουν στην αλληλουχία ενίσχυσης και επιτρέπουν την δράση της DNA πολυμεράσης. Η ποσοτικοποίηση του DNA είναι δυνατόν να γίνει με φθορίζουσες χρωστικές ή ανιχνευτές που εκπέμπουν φθορισμό. Ο φθορισμός είναι ανάλογος της αρχικής ποσότητας του DNA και της σταδιακής ενίσχυσης για αυτό και η μέτρηση του φθορισμού λαμβάνει μέρος σε κάθε κύκλο της αντίδρασης στο τέλος κάθε φάσης ενίσχυσης. Το κύριο πλεονεκτήματα της RT-PCR είναι η ευαισθησία της καθώς επιτρέπει την ειδική ενίσχυση τμημάτων και μπορεί να ανιχνεύσει αρκετά χαμηλά επίπεδα φθορισμού και άρα συγκεντρώσεων DNA. Η χρωστική που είναι υπεύθυνη για την εκπομπή του φθορισμού που χρησιμοποιήθηκε στην συγκεκριμένη περίπτωση και χρησιμοποιείται ευρέως είναι η SYBR-green. Συνδέεται στο DNA και ειδικότερα στο δίκλωνο DNA όπου και παρουσιάζει την μεγαλύτερη εκπομπή φθορισμού κατά την διέγερση. Μετά από κάθε ενίσχυση το σήμα αυξάνεται σταδιακά και κάποια στιγμή φτάνει ένα κατώφλι επιτρέποντας την ανίχνευση του σήματος φθορισμού σε κάποιον κύκλο Ct. Όσο μικρότερος είναι ο αριθμός Ct τόσο μεγαλύτερη είναι η αρχική ποσότητα του DNA πριν την ενίσχυση και άρα του μεταγράφου του γονιδίου που εκφράζεται. Μετρώντας την ένταση του φθορισμού σε κάθε κύκλο, μπορούμε να προσδιορίσουμε την αρχική ποσότητα του DNA στο δείγμα.

Για την διαγωγή του πειράματος τα eppendorf με τα περιεχόμενα της αντίδρασης τοποθετήθηκαν να ξεπαγώσουν σε πάγο. Τα διαλύματα που περιείχαν τους εκκινητές και το cDNA υποβλήθηκαν σε σύντομη φυγοκέντρηση με σκοπό την καθίζηση του περιεχομένου. Το κάθε δείγμα της αντίδρασης έχει τελικό όγκο 10ul, και αποτελείται από 9ul διαλύματος SYBR™ Green Universal Master Mix και 1ul cDNA. Συνολικά παρασκευάστηκαν ίσος αριθμός master mix με τον αριθμό των γονιδίων και του δείγματος ελέγχου. Οι όγκοι των συστατικών αναφέρονται στον πίνακα 4.2. Η κάθε συνθήκη φορτώθηκε 2 φορές με δύο δείγματα για την καλύτερη απόδοση αποτελεσμάτων καθώς η RT-qPCR αποτελεί μία ευαίσθητη τεχνική. Ο κάθε κύκλος της αντίδρασης χαρακτηρίζεται από τα εξής επιλεγμένα στάδια χρόνου και θερμοκρασίας ρυθμισμένα πάνω στα χαρακτηριστικά των εκκινητών του πειράματος : 1. Για 2 λεπτά σε θερμοκρασία 50°C (για την ενεργοποίηση του ενζύμου της πολυμεράσης DNA) , 2. 10 λεπτά σε θερμοκρασία 94°C (για αποδιάταξη δίκλωνου DNA), 3. 15 δευτερά σε θερμοκρασία 95°C (επιβεβαιώνεται η συνολική αποδιάταξη του υποστρώματος), 4.1 λεπτό σε θερμοκρασία 61°C για την υβριδοποίηση

εκκινητών/DNA και την επιμήκυνση/σύνθεση του νέου υποστρώματος. Συνολικά ολοκληρώθηκαν 37 κύκλοι μέχρι το τέλος της RT-PCR.

Η αναπαράσταση των αποτελεσμάτων της έκφρασης με βάση του κύκλους της RT-qPCR έγινε με το πρόγραμμα GraphPad Prism. Η οπτικοποίηση των αποτελεσμάτων ακολούθησε μετά την επεξεργασία η οποία αφορά κάποιες μαθηματικές τροποποιήσεις με την μέθοδο της σχετικής ποσοτικοποίησης η οποία αξιοποιείται σε αντιδράσεις όμοιας απόδοσης (efficiency, E). Η μέθοδος βασίζεται στον λόγο της έκφρασης του γονιδίου ενδιαφέροντος ως προς την έκφραση του γονιδίου αναφοράς και αρχικά υπολογίζεται η διαφορά των κύκλων ΔC_t για τις επαναλήψεις του κάθε γονιδίου (HJV, SKP2, SEPARIN, 18S) και έπειτα ο λόγος των ΔC_t για το κάθε γονίδιο προς το 18S. Η στατιστική σημαντικότητα προκύπτει ως αποτέλεσμα της διαφοράς των επιπέδων mRNA και έκφρασης για στις συνθήκες της υποξίας και της υποξίας με αποσιώπηση του HIF-2α μετά από αφαίρεση των ΔC_t της νορμοξίας. Έπειτα οι τιμές κανονικοποιούνται και διαμορφώνονται τα αποτελέσματα

<u>ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΟ</u>	<u>ΟΓΚΟΣ (μl)</u>
H ₂ O	3.2
Forward Primer	0.4
Reverse Primer	0.4
Template	1
SYBGR mix	5
ΣΥΝΟΛΟ	10

Πίνακας 4.2

4.2.14 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτής αгарόζης

Η ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης αποτελεί μία χρήσιμη μέθοδος για την ανάλυση μακρομορίων (DNA, RNA, Πρωτεΐνες) και χρησιμοποιείται στην βιοχημεία και την μοριακή

γενετική. Χρησιμοποιείται ευρέως για νουκλεοτιδικές αλληλουχίες και μας επιτρέπει να τις αναλύσουμε με βάση το μοριακό βάρος τους και επομένως το μήκος τους. Η μέθοδος βασίζεται στην πήκτη που δημιουργείται μέσω των δεσμών υδρογόνου που έχει ως αποτέλεσμα η θέρμανση και έπειτα η ψύξη του διαλύματος πηκτής και μας επιτρέπει στο πολυμερές πλέγμα με την διενέργεια ηλεκτρικού ρεύματος τον διαχωρισμό μορίων με βάση το μήκος των τμημάτων. Μπορούν να αναλυθούν γραμμικά αλλά και κυκλικά τμήματα DNA. Ανάλογα με το μήκος των τμημάτων που ηλεκτροφορούμε επιλέγουμε την κατάλληλη συγκέντρωση αγαρόζης η οποία είναι μεταξύ συνήθως 1-2% και επιλέγουμε μεγαλύτερη συγκέντρωση όσο μικρότερα είναι τα τμήματα που αναλύουμε. Η παρατήρηση των έγινε εφικτή χάρη στο βρωμιούχο αιθίδιο, υπό υπεριώδες φως. Η ένταση του φωτός εξαρτάται από την ποσότητα του δείγματος. Η ηλεκτροφόρηση σε αγαρόζη για DNA είναι χρήσιμη για την απομόνωση DNA, την ανάλυση τμημάτων μετά από πέψη με ενδονουκλεάσες και γενικότερα την ανάλυση τμημάτων με βάση το μήκος τους. Στην συγκεκριμένη έρευνα η πηκτή αγαρόζης χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση των προϊόντων της RT-qPCR. Αρχικά η ποσότητα της αγαρόζης για 2% διαλύθηκε σε 100ml ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης (running buffer) και θερμάνθηκε στο φούρνο μικροκυμάτων. Μετά την διαλυτοποίηση η φιάλη με το διάλυμα ψύχθηκε κάτω από το νερό σε τελική θερμοκρασία <60°C. Προστέθηκαν 2μl του βρωμιούχου αιθιδίου. Μετά από ανάδευση το διάλυμα της πηκτής μεταφέρθηκε στο καλούπι για να στερεοποιηθεί. Ύστερα αφαιρέθηκε το χτενάκι και η πηκτή μεταφέρθηκε στην συσκευή ηλεκτροφόρησης. Προστέθηκε διάλυμα ηλεκτροφόρησης και αφού φορτώθηκαν τα δείγματα αρχίσε η ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων.

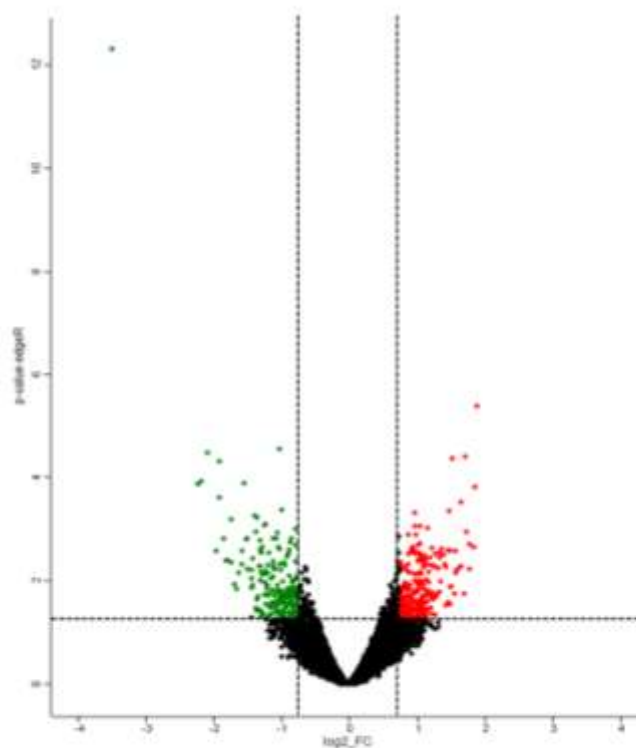
5. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

5.1 Βιοπληροφορική ανάλυση RNA-seq

Το πρώτο μέρος της πτυχιακής αφορά την βιοπληροφορική μεταγραφομική ανάλυση των γονιδίων η οποία θα εξετάσει τις διαφορές της μεταβολής της έκφρασης γονιδίων στις συνθήκες υποξίας και της υποξίας με ταυτόχρονη αποσιώπηση της έκφρασης του HIF-2α. Αρχικά εντοπίζουμε τα γονίδια των οποίων αυξάνεται και μειώνεται η έκφραση απουσία της παρουσίας του HIF-2α σε συνθήκες υποξίας με την δημιουργία του volcano plot από τα δεδομένα RNA-seq. Έπειτα πραγματοποιούμε ανάλυση οντολογίας για τα γονίδια αυτά και στις συνθήκες όπου μειώνεται η έκφραση των γονιδίων αναζητούμε τις κυτταρικές τους λειτουργίες.

5.1.1 Μεταγραφομική Ανάλυση με αποσιώπηση του HIF-2α στην υποξία

Η στατιστική επεξεργασία των δεδομένων RNA-seq αφορά δύο συνθήκες κυττάρων: την υποξία και την υποξία με αποσιώπηση του μεταγραφικού παράγοντα HIF-2α με τη χρήση siRNA. Το volcano plot επιτρέπει τον εντοπισμό και τη γραφική αναπαράσταση όλων των γονιδίων που αναγνωρίστηκαν κατά την αλληλούχηση RNA με μία κουκίδα. Τα γονίδια των οποίων η έκφραση παρουσιάζει στατιστικά σημαντική αλλαγή μεταξύ των συνθηκών εντοπίζονται με χρωματική κωδικοποίηση. Συγκεκριμένα, τα γονίδια με αυξημένη έκφραση λόγω της αποσιώπησης του HIF-2α αντιστοιχούν σε κόκκινες κουκίδες, ενώ τα γονίδια με μειωμένη έκφραση αντιστοιχούν σε πράσινες κουκίδες. Τα γονίδια που δεν παρουσιάζουν στατιστικά σημαντική αλλαγή στην έκφρασή τους μεταξύ των δύο συνθηκών αναπαρίστανται με μαύρες κουκίδες. Για να θεωρηθεί ένα γονίδιο στατιστικά διαφοροποιημένο στις δύο συνθήκες, τέθηκαν ως προϋποθέσεις ένα $p\text{-value} \leq 0.05$ και μια μεταβολή της έκφρασης κατά τουλάχιστον 75% (1,75) είτε αύξηση είτε μείωση. Από το γράφημα προκύπτει ότι συνολικά από τα 411 γονίδια που αλλάζει η έκφρασή τους, 187 γονίδια παρουσιάζουν αυξημένη έκφραση και 224 γονίδια παρουσιάζουν μειωμένη έκφραση. Στο πλαίσιο της πτυχιακής εργασίας, κρίθηκε ως πιο σημαντική η εστίαση και η μελέτη των γονιδίων με μειωμένη έκφραση, η οποία θα αναλυθεί στο επόμενο στάδιο.



Διάγραμμα 5.1: Volcano plot Υποξία VS Υποξία siHIF-2α των γονιδίων της RNA-seq.

Παρουσιάζονται τα γονίδια με στατιστικά διαφορετική έκφραση με την αποσιώπηση του HIF-2α στην υποξία. Με πράσινο αναπαρίστανται τα γονίδια με στατιστικά μειωμένη έκφραση (184) και με κόκκινο τα γονίδια με στατιστικά αυξημένη έκφραση (224). Στον x άξονα αναπαρίσταται το εύρος αλλαγής της έκφρασης σε μορφή $\log_2$ (>0 αυξημένη έκφραση, <0 αντανάκλα μειωμένη έκφραση, όριο αλλαγής της έκφρασης ορίστηκε 1,75/75%), στον y άξονα αναπαρίσταται η στατιστική σημαντικότητα p -value EdgeR ($\leq 0.05\% = -\log_{10} = 1.3 \leq$)

5.1.2 Ανάλυση Οντολογίας

Η ανάλυση οντολογίας για τα γονίδια πραγματοποιήθηκε χωριστά για τα γονίδια που παρουσιάζουν αυξημένη έκφραση και για τα γονίδια που παρουσιάζουν μειωμένη έκφραση. Κάθε ράβδος αναπαριστά μία βιολογική διεργασία, η οποία μπορεί να είναι είτε ευρύτερη είτε ειδικότερη. Το μήκος της μπάρας είναι ανάλογο της στατιστικής σημαντικότητας, που περιγράφει τη συσχέτιση των γονιδίων με την εν λόγω διεργασία. Για την ανάλυση, όλες οι βιολογικές διεργασίες που περιλαμβάνονται είναι στατιστικά σημαντικές και αντιστοιχούν στις 15

περισσότερο σημαντικές. Το χρώμα των οριζόντιων στηλών αναπαριστά τον αριθμό των γονιδίων που αποδίδονται σε αυτές και η ένταση του χρώματος είναι ανάλογη του αριθμού των γονιδίων. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης οντολογίας συνδέουν τα γονίδια που αυξάνεται ή μειώνεται η έκφραση τους με την αποσιώπηση του HIF-2α, με βιολογικές λειτουργίες και μοριακούς μηχανισμούς του κυττάρου και παθογένεια, ανάλογα με τα γονίδια που συμμετέχουν σε αυτές τις αποκρίσεις και συνεπώς μπορούμε έτσι να σχηματίσουμε μία καλύτερη εικόνα για τις λειτουργίες του HIF-2α στο κύτταρο. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται χωριστά για τα γονίδια που αυξάνεται και μειώνεται η έκφρασή τους στην αποσιώπηση του HIF-2α. Τα αποτελέσματα φαίνονται στα διαγράμματα (βλέπε 5.2, 5.3, 5.4, 5.5). Η κάθε εικόνα ταυτίζεται με την αναζήτηση της ανάλυσης οντολογίας σε μία συγκεκριμένη βάση κυτταρικών μονοπατιών δηλαδή είτε με τα μονοπάτια KEGG, BP, PANTHER και REATOME.

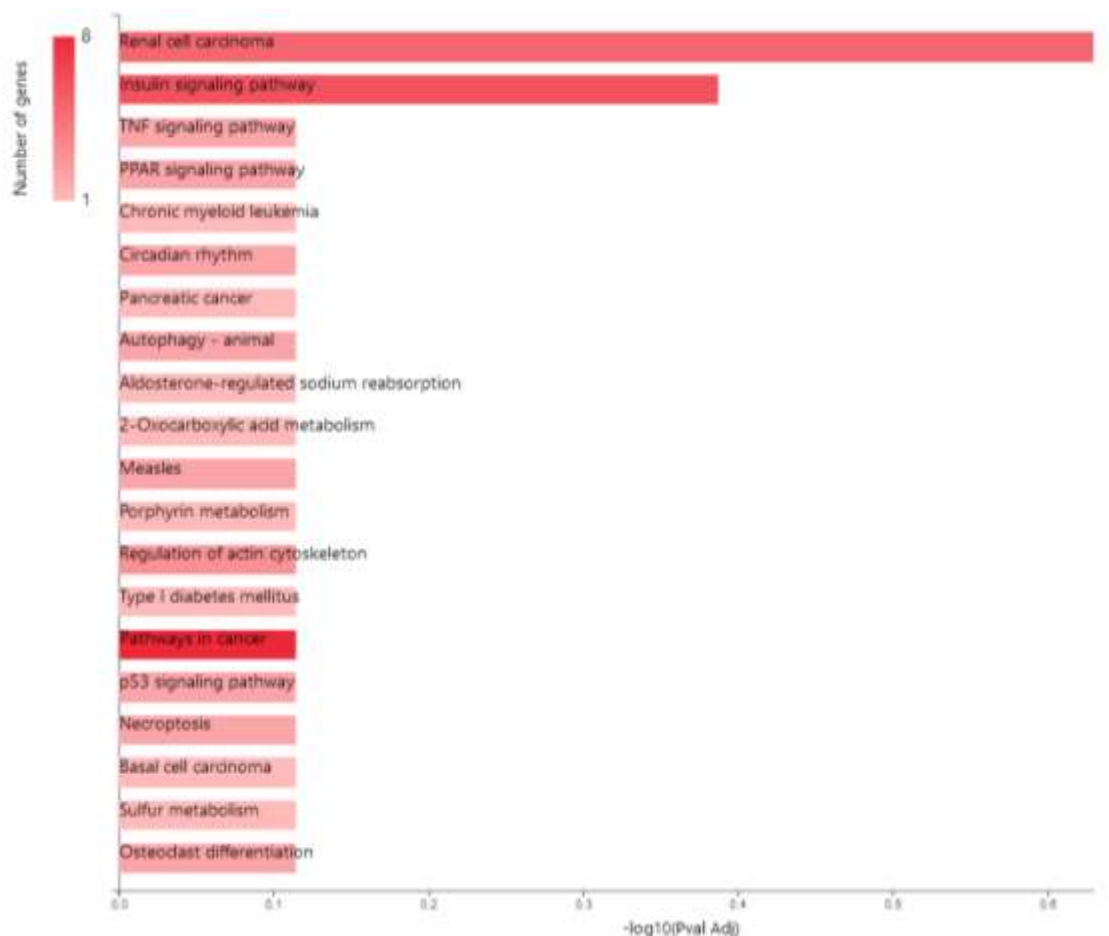
5.1.3 Ανάλυση Οντολογίας Αυξορρυθμιζόμενων Γονιδίων

Παρακάτω είναι ορατά τα διαγράμματα οντολογίας όσον αφορά τους κυτταρικούς μηχανισμούς που συμμετέχουν τα γονίδια με αυξημένη μεταγραφή κατά την αποσιώπηση του HIF-2α στην υποξία. Πρωτίστως στα KEGG μονοπάτια φαίνεται η σύνδεση πολλών γονιδίων με τον καρκίνο γενικότερα (APAF1, TXNRD2, CREBBP, PIK3CA) και τον νεφρικό (CREBBP, PIK3CA) και το παγκρεατικό (PIK3CA) (βλέπε διάγραμμα 5.3), παρόλα αυτά τα KEGG μονοπάτια δεν αποδίδουν αποτελέσματα με ειδικούς κυτταρικούς μηχανισμούς. Επίσης, πολλά γονίδια (MAP2K5, HOXA7, ZBTB1) συνδέονται με την αρνητική ρύθμιση της μεταγραφής από την πολυμεράση II (βλέπε διάγραμμα 5.2) και γονίδια (TBP) που επηρεάζουν την μεταγραφή της πολυμεράσης I (βλέπε διάγραμμα 5.4). Ταυτόχρονα ένας αριθμός γονιδίων ψευδαργύρου (MT1F, MT2A, MT1E) συμμετέχουν σε διάφορα μεταβολικά και σηματοδοτικά μονοπάτια όπως και στην ομοιόσταση μετάλλων του και του χαλκού (βλέπε διάγραμμα 5.2). Όπως δηλώνει και ο ρόλος του HIF-2α επάγεται η μεταγραφή γονιδίων απόκρισης στην υποξία και της αγγειογένεσης. Όμως αξίζει να σημειωθεί πως είναι εμφανές με την αποσιώπηση του HIF-2α αύξηση της έκφραση γονιδίων (GAB1, TSC2, PTPN3) στα σηματοδοτικά μονοπάτια παραγόντων VEGF, EGF, PDGF της αγγειογένεσης (βλέπε διάγραμμα 5.4, 5.5). Ίσως επιδεικνύεται ένας πιθανός μηχανισμός απόκρισης στην απώλεια λειτουργίας του HIF-2α. Τα περισσότερα από τα γονίδια που

αναφέρονται είναι μέρος στην σηματοδότηση κινασών που έχουν ρόλο στον καρκίνο, στην βλάβη του DNA, στην κυτταροκίνηση και τον πολλαπλασιασμό.

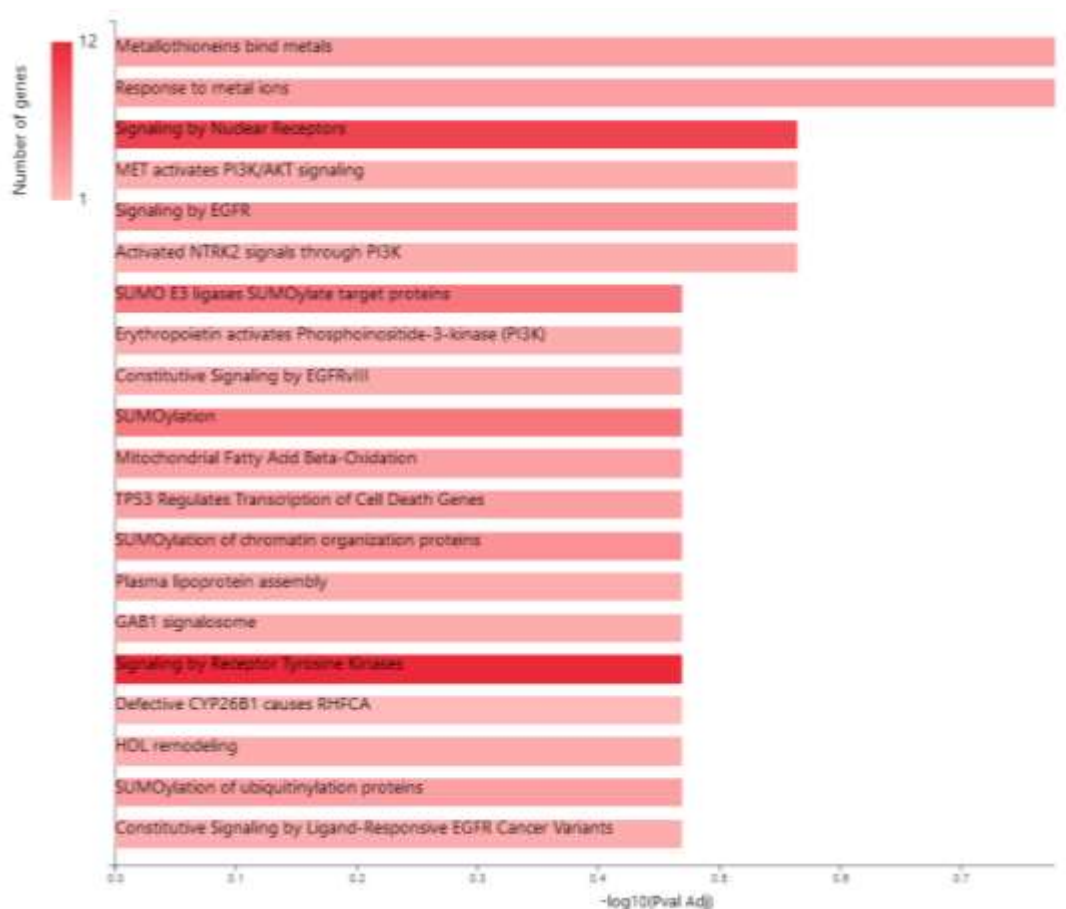


Διάγραμμα 5.2: Ραβδογράφημα αυξορρυθμιζόμενων γονιδίων για GO BP μονοπάτια. Στον άξονα x αναπαρίστανται οι μπάρες που αντιστοιχούν σε βιολογικές διεργασίες με σειρά στατιστικής σημαντικότητας, η ένταση του χρώματος της μπάρας αναλογεί στον αριθμό των γονιδίων της ανάλυσης που συμμετέχουν στην βιολογική διεργασία. Στον άξονα y αναπαρίστανται η στατιστική σημαντικότητα $-\log_{10} \text{Adjusted } p\text{-value}$.



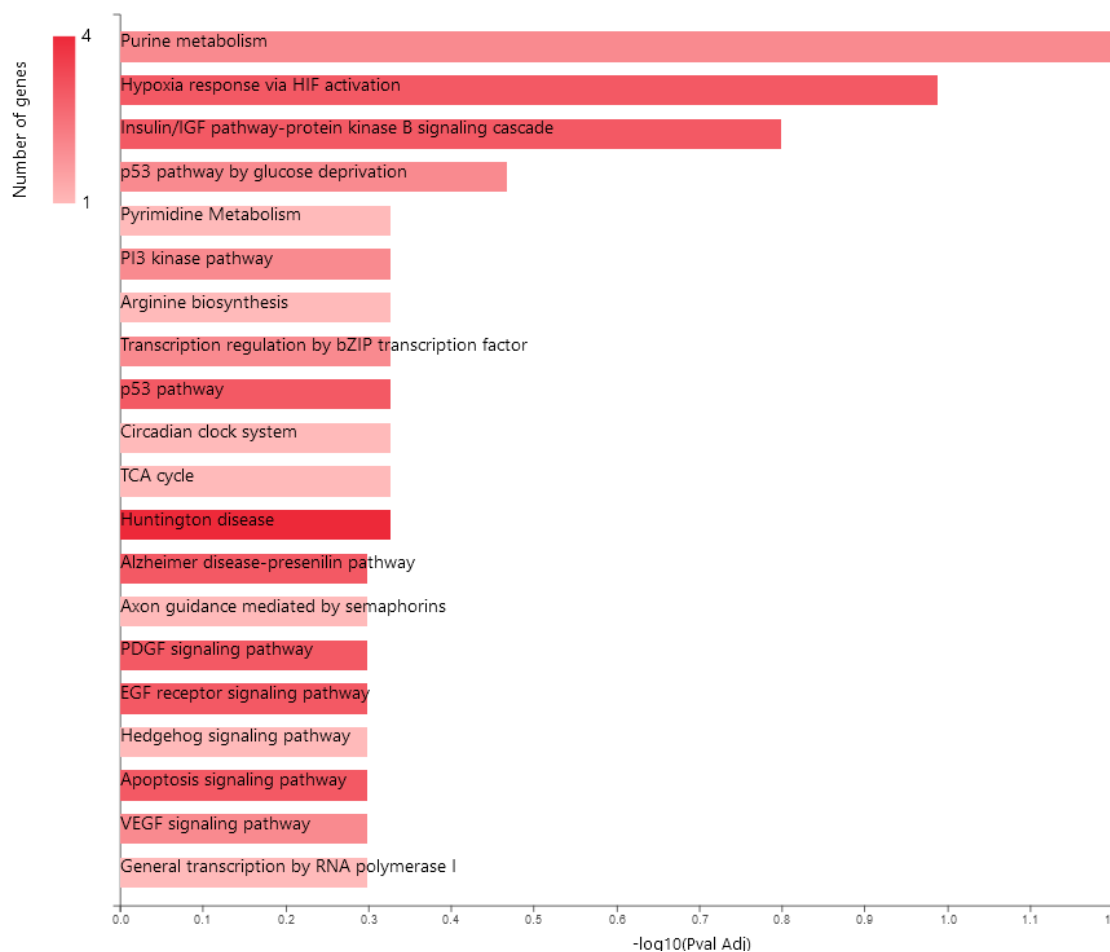
Διάγραμμα 5.3: Ραβδογράφημα αυξορρυθμιζόμενων γονιδίων για KEGG μονοπάτια

Στον άξονα x αναπαρίστανται οι μπάρες που αντιστοιχούν σε βιολογικές διεργασίες με σειρά στατιστικής σημαντικότητας, η ένταση του χρώματος της μπάρας αναλογεί στον αριθμό των γονιδίων της ανάλυσης που συμμετέχουν στην βιολογική διεργασία. Στον άξονα y αναπαρίσταται η στατιστική σημαντικότητα $-\log_{10} Adjusted p\text{-value}$



Διάγραμμα 5.4: Ραβδογράφημα αυξορρυθμιζόμενων γονιδίων για PANTHER μονοπάτια

Στον άξονα x αναπαρίστανται οι μπάρες που αντιστοιχούν σε βιολογικές διεργασίες με σειρά στατιστικής σημαντικότητας, η ένταση του χρώματος της μπάρας αναλογεί στον αριθμό των γονιδίων της ανάλυσης που συμμετέχουν στην βιολογική διεργασία. Στον άξονα y αναπαρίσται η στατιστική σημαντικότητα $-\log_{10} Adjusted p\text{-value}$

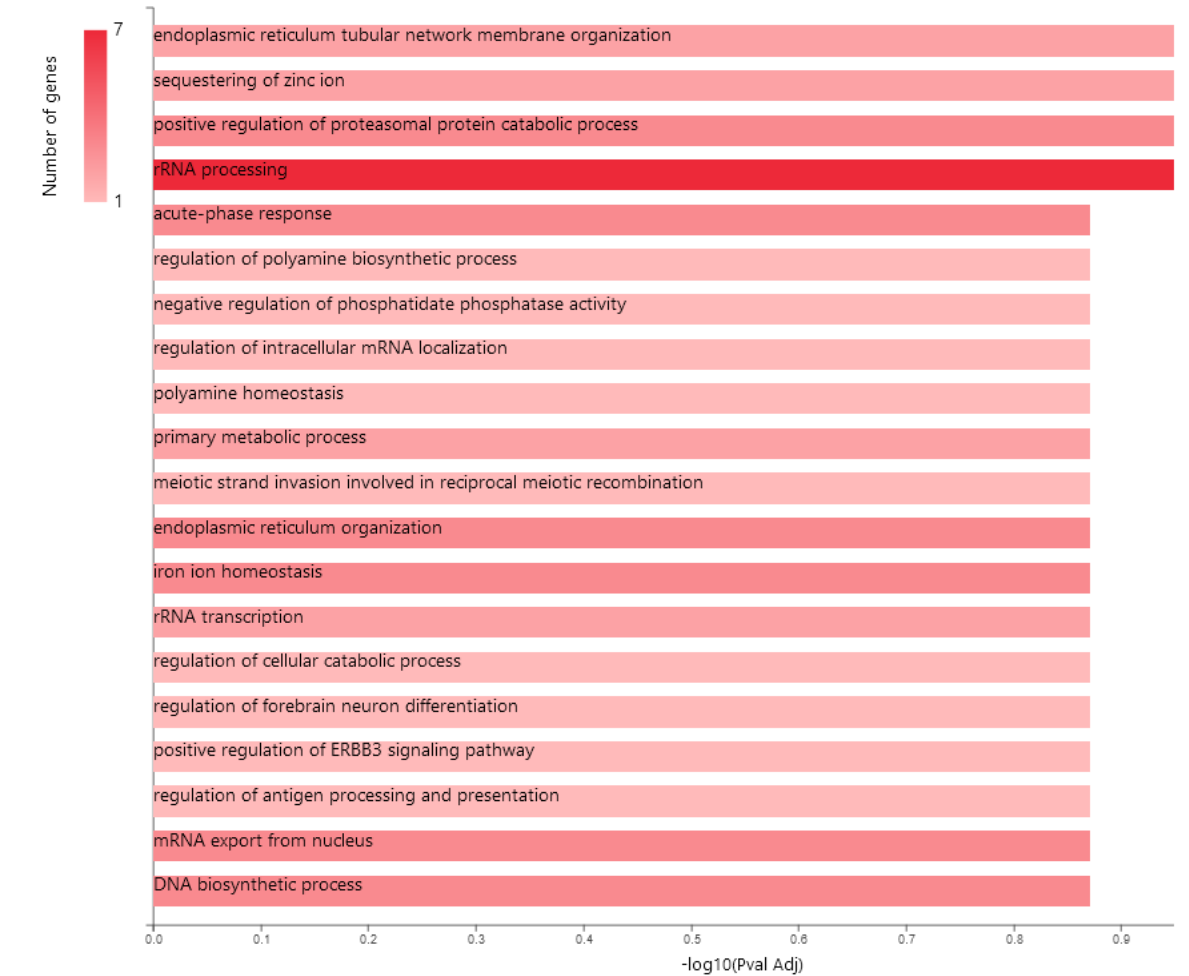


Διάγραμμα 5.5: Ραβδογράφημα αυξορρυθμιζόμενων γονιδίων για REACTOME μονοπάτια

Στον άξονα x αναπαρίστανται οι μπάρες που αντιστοιχούν σε βιολογικές διεργασίες με σειρά στατιστικής σημαντικότητας, η ένταση του χρώματος της μπάρας αναλογεί στον αριθμό των γονιδίων της ανάλυσης που συμμετέχουν στην βιολογική διεργασία. Στον άξονα y αναπαρίσταται η στατιστική σημαντικότητα $-\log_{10} \text{Adjusted } p\text{-value}$

5.1.4 Ανάλυση Οντολογίας Μειορρυθμιζόμενων Γονιδίων

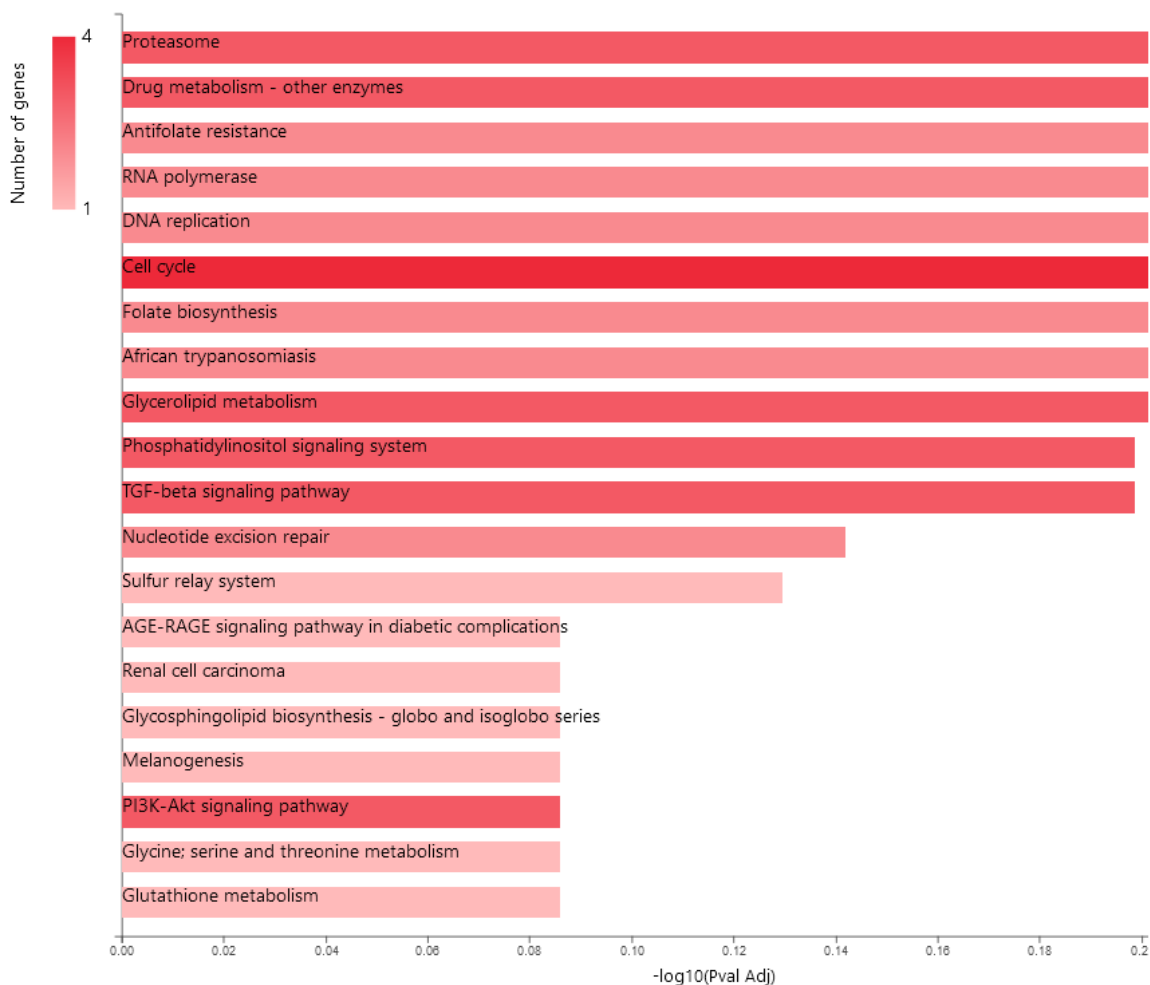
Τα γονίδια αυτά συνδέονται όπως φαίνεται στα παρακάτω διαγράμματα με τις διεργασίες που αναφέρονται στις μπάρες και αφορούν ένα διευρυμένο σύνολο κυτταρικών μηχανισμών. Όπως καταδεικνύουν τα ευρήματα πιο εμφανής ρόλος είναι η συμβολή των γονιδίων στον κυτταρικό κύκλο. Τα διαγράμματα (βλέπε 5.7, 5.9) , δείχνουν πως τα γονίδια που εμπλέκονται καθορίζουν ρυθμιστικά τον κυτταρικό κύκλο και την αντιγραφή του DNA (CDT1, ORC1) και όπως δείχνουν τα αποτελέσματα των μονοπατιών Reactome (βλέπε διάγραμμα 5.10) , ιδιαίτερος ρόλος γονιδίων (E2F4, SKP2, ORC6) αποδίδεται στην μετάβαση του κυτταρικού κύκλου από την G1 στην S φάση και την μίτωση. Το γονίδιο SEPARIN συμμετέχει στην μίτωση. Στην ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου συμμετέχει επίσης μια κύρια ρυθμιστική πρωτεΐνη η SKP2 και ο κύριος ρόλος της είναι η ρύθμιση πρωτεϊνών που καθορίζουν την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου. Επίσης, φαίνεται κάποια από τα γονίδια διαδραματίζουν ρόλο στην ρύθμιση της μεταγραφής στο στάδιο G1/S (LIN9, E2F4, TK1) (βλέπε διάγραμμα 5.9) από την πολυμεράση I του DNA (POLR1B) (βλέπε διάγραμμα 5.8). Από το σύνολο των αποτελεσμάτων προκύπτει η ρύθμιση της ομοιόστασης σιδήρου, θείου (MOCS2) και διάφορων μεταβολικών κυτταρικών μονοπατιών (βλέπε διαγράμματα 5.6, 5.7, 5.8). Το κύριο γονίδιο που συμμετέχει τόσο στον μεταβολισμό και την ομοιόσταση του σιδήρου είναι το HJV το οποίο κωδικοποιεί την αιμοτζουβελίνη. Τα γονίδια αυτά είναι ιδιαίτερα σημαντικά γιατί χαρακτηρίζονται από στατιστική μείωση της έκφρασης με την αποσιώπηση του HIF-2α και επομένως από ρυθμίζονται θετικά από τον HIF-2α.



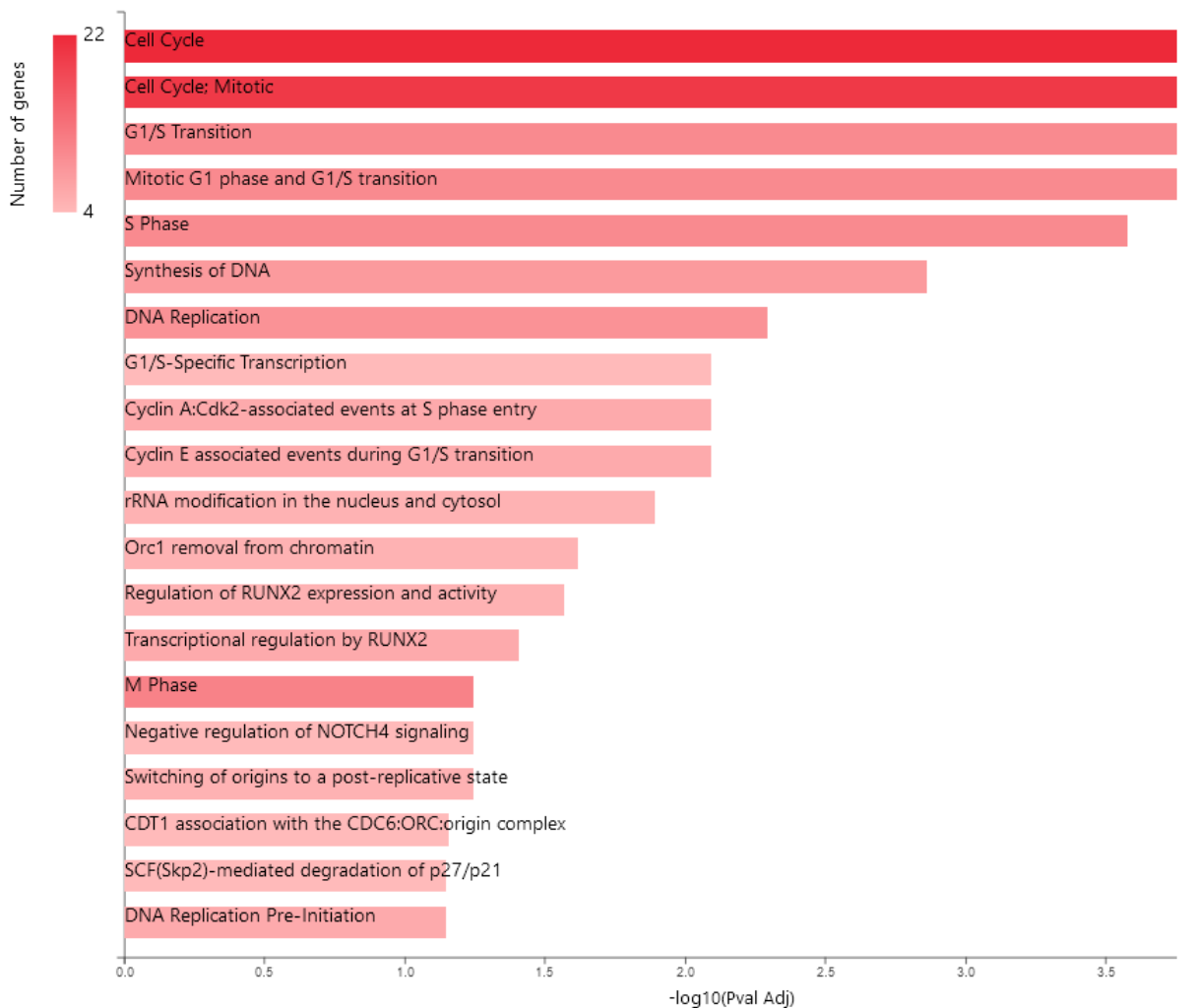
Διάγραμμα 5.6: Ραβδογράφημα μειορρυθμιζόμενων γονιδίων για GO BP μονοπάτια. Στον άξονα x αναπαρίστανται οι μπάρες που αντιστοιχούν σε βιολογικές διεργασίες με σειρά στατιστικής σημαντικότητας, η ένταση του χρώματος της μπάρας αναλογεί στον αριθμό των γονιδίων της ανάλυσης που συμμετέχουν στην βιολογική διεργασία. Στον άξονα y αναπαρίσταται η στατιστική σημαντικότητα $-\log_{10}$ Adjusted p-value



Διάγραμμα 5.7: Ραβδογράφημα μειορρυθμιζόμενων γονιδίων για KEGG μονοπάτια. Στον άξονα x αναπαρίστανται οι μπάρες που αντιστοιχούν σε βιολογικές διεργασίες με σειρά στατιστικής σημαντικότητας, η ένταση του χρώματος της μπάρας αναλογεί στον αριθμό των γονιδίων της ανάλυσης που συμμετέχουν στην βιολογική διεργασία. Στον άξονα y αναπαρίστανται η στατιστική σημαντικότητα $-\log_{10}$ Adjusted p-value



Διάγραμμα 5.8: Ραβδογράφημα μειορρυθμιζόμενων γονιδίων για PANTHER μονοπάτια. Στον άξονα x αναπαρίστανται οι μπάρες που αντιστοιχούν σε βιολογικές διεργασίες με σειρά στατιστικής σημαντικότητας, η ένταση του χρώματος της μπάρας αναλογεί στον αριθμό των γονιδίων της ανάλυσης που συμμετέχουν στην βιολογική διεργασία. Στον άξονα y αναπαρίσταται η στατιστική σημαντικότητα $-\log_{10}$ Adjusted p-value



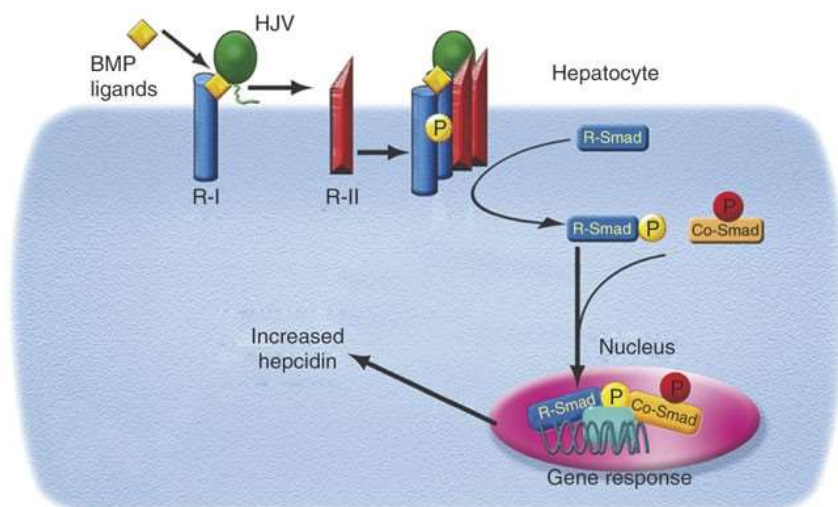
Διάγραμμα 5.9: Ραβδογράφημα μειορρυθμιζόμενων γονιδίων για REACTOME μονοπάτια. Στον άξονα x αναπαρίστανται οι μπάρες που αντιστοιχούν σε βιολογικές διεργασίες με σειρά στατιστικής σημαντικότητας, η ένταση του χρώματος της μπάρας αναλογεί στον αριθμό των γονιδίων της ανάλυσης που συμμετέχουν στην βιολογική διεργασία. Στον άξονα y αναπαρίσται η στατιστική σημαντικότητα $-\log_{10}$ Adjusted p-value

5.2 Γονίδια που επιλέχθηκαν από την Βιοπληροφορική Ανάλυση

Συνεπώς στο πλαίσιο της πτυχιακής έρευνας τα μειορρυθμιζόμενα γονίδια μελετήθηκαν περαιτέρω και αυτά τα HJV, SKP2, SEPARIN επιλέχθηκαν για τα ακόλουθα πειράματα και εξετάστηκαν τα επίπεδα έκφρασης του με RT-PCR.

5.2.1 Γονίδιο HJV

Το γονίδιο της αιμοτζουβελίνης HJV/HFE2 κωδικοποιεί για την μεμβρανοσύνδετη αιμοτζουβελίνη [48], μία πρωτεΐνη που συνδέεται στον συνυποδοχέα των μορφογενετικών παραγόντων των οστών BMPs που ανήκουν στην υπεροικογένεια των TGF- β . Εκφράζεται στο ήπαρ αλλά και στους σκελετικούς μύες και στην καρδιά αν και ο ρόλος της εκτός του ήπατος δεν είναι ακόμα γνωστός [49, 50]. Συνδέεται στην μεμβράνη με μία άγκυρα γλυκοζυλοφωσφατιδυλοϊνοσιτόλης. Η αιμοτζουβελίνη ελέγχει θετικά την έκφραση της εψιδίνης (hepcidin) της κύριας ρυθμιστικής ορμόνης της ομοιόστασης του σιδήρου η οποία παράγεται στο ήπαρ. Η HJV συνδέεται κυρίως στον BMP-2 και οδηγεί σε φωσφορυλιώσεις των SMAD πρωτεϊνών που ετεροδιμερίζονται και τελικά εισέρχονται στον πυρήνα και επάγουν την έκφραση της εψιδίνης. Η έκφραση της εψιδίνης αυξάνεται όταν ο οργανισμός είναι πλούσιος σε σίδηρο και προκαλεί την μείωση της απορρόφησης του σιδήρου από το έντερο και την ανακύκλωσή του από τα μακροφάγα οδηγώντας στην ενδοκύττωση και πρωτεόλυση της φερροπορτίνης [51]. Εκτός από την μεμβρανοσύνδετη μορφή m-HJV υπάρχει και μία διαλυτή μορφή s-HJV που προκύπτει με πέψη της φουρίνης περισσότερο στους σκελετικούς μύες, και δρα ρυθμίζοντας αρνητικά την εψιδίνη δεσμεύοντας BMP υποδοχείς [52, 53]. Απουσία της HJV οδηγεί σε υπερφόρτωση σιδήρου και άτομα με γενετικές μεταλλάξεις στο γονίδιο της HJV πάσχουν από αιμοχρωμάτωση 2A [50]. Η έκφραση της εψιδίνης σε ηπατοκύτταρα Huh-7 έχει προηγουμένως διαπιστωθεί πως επηρεάζεται από την δράση 2-oxoglutarate υδροξυλασών που υδροξυλιώνουν ανοδικά του γονιδίου της εψιδίνης και αυξάνουν την μεταγραφική ενεργότητα του η οποία μειώνεται στην υποξία [54]. Αν και δεν έχει βρεθεί κάποια άμεση ρύθμιση από τους HIF με σύνδεση σε HREs στο γονίδιο της εψιδίνης.



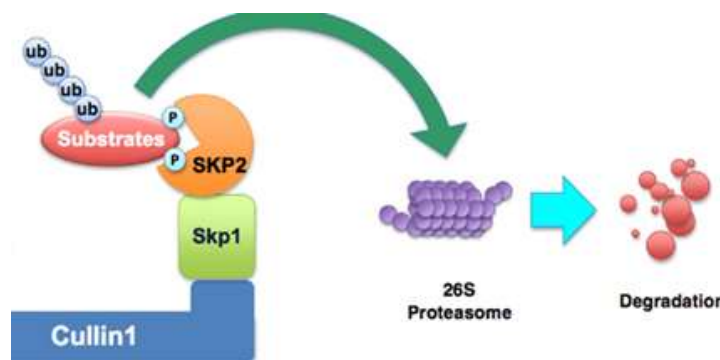
Εικόνα 5.1: Η μεμβρανosύνδετη HJV στο κύτταρο οδηγεί στην έκφραση της εμψιδίνης.

Babitt, J. L., et al (2006). *Nature Genetics* [52]

5.2.2 Γονίδιο SKP2

Το γονίδιο SKP2 μεταγράφει την πρωτεΐνη S-phase kinase associated protein 2 (SKP2) με μοριακό βάρος 45kDa η οποία αποτελεί μέρος του συμπλόκου λιγάσης της ουβικουιτίνης E3. Υπάρχουν παραπάνω από ένα σύμπλοκα λιγάσης της ουβικουιτίνης αλλά οι διαφορετικές πρωτεΐνες που τα αποτελούν έχουν όμοια δομή και λειτουργία [55]. Η SKP2 είναι μία F-box πρωτεΐνη μέρος του συμπλόκου Cullin-1, Skp1, Rbx1, SKP2, που αναγνωρίζει άλλες πρωτεΐνες κατά κανόνα φωσφορυλιωμένες και προσδένεται σε αυτές με το καρβοξυτελικό άκρο της άκρο με μια περιοχή πλούσια σε επαναλήψεις λευκίνης LRR, ενώ στο σύμπλοκο της λιγάσης συνδέεται με το αμινοτελικό της άκρο και έτσι τελικά τις οδηγεί σε πρωτεόλυση στο πρωτεάσωμα [56, 57]. Η SKP2 αποτελεί ρυθμιστή του κυτταρικού κύκλου και συνδέεται άμεσα με την ρύθμιση πρωτεϊνών που ελέγχουν την μετάβαση του κυτταρικού κύκλου. Έχει μελετηθεί και έχει επιβεβαιωθεί ως ογκογονίδιο σε ορισμένους τύπου καρκίνου με αυξημένη έκφραση. Κάποιοι από τους κυριότερους στόχους της είναι τα p21 και p27 και οι Κυκλίνες D και E. Απώλεια έκφρασης και λειτουργίας της SKP2 οδηγεί σε κυτταρική συσσώρευση του p27 και σε παύση του κυτταρικού κύκλου στην G1 φάση [58, 59]. Επίσης η SKP2 συνδέεται και δημιουργεί σύμπλοκο με την p300. Αυξημένη έκφραση της SKP2 οδηγεί σε μειωμένη αλληλεπίδραση και λειτουργία της p300 όπως στο p53 οδηγώντας σε συσσώρευση γονιδιωματικών μεταλλάξεων [60]. Σε πρόσφατη έρευνα ο HIF-1α έχει βρεθεί σε καρκινικά κύτταρα του παγκρέατος ως θετικός ρυθμιστής της έκφρασης της

SKP2. Επίσης έχει αποδειχθεί ότι τα επίπεδα mRNA του γονιδίου SKP2 μειώνονται όταν απουσιάζει λειτουργικός VHL και προκαλείται γήρανση (senescence) στο κύτταρο [61].



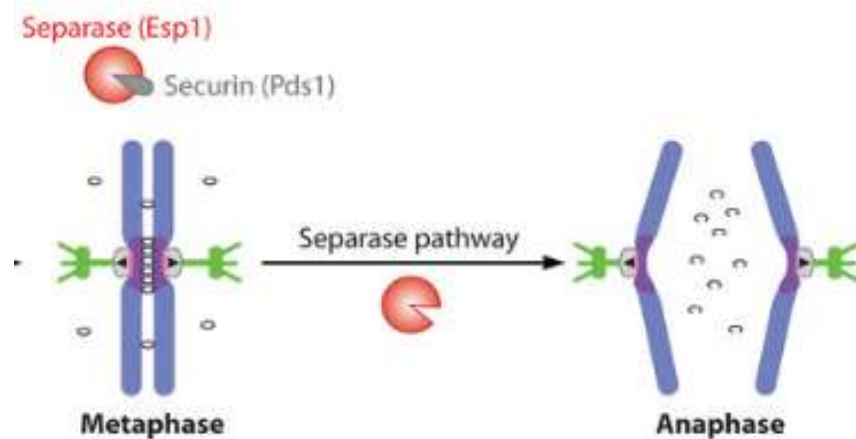
Εικόνα 5.2: Η SKP2 ως μέρος του συμπλόκου της λιγάσης της ουβικουιτίνης,

Wang, Z., et al (2012). *Frontiers in Oncology* [62]

5.2.3 Γονίδιο SEPARIN

Το γονίδιο SEPARIN/ESPL1 κωδικοποιεί για την διαχωριστάση, μία ευκαρυωτική πρωτεΐνη μεγάλου μοριακού βάρους με ενζυμική δράση κυστεϊκής ενδοπεπτιδάσης. Η ενζυμική επικράτεια στο καρβοξυτελικό άκρο είναι η πιο συντηρημένη περιοχή της πρωτεΐνης ανάμεσα στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς. Εμπλέκεται σε πολλές διεργασίες και κατέχει παραπάνω από έναν ρόλους. Συμμετέχει στην ρύθμιση της απόπτωσης, την επιδιόρθωση του DNA και τον διπλασιασμό των κεντροσωμάτων. Όμως ο πιο σημαντικός ρόλος της διαχωριστάσης υφίσταται στον διαχωρισμό των αδελφών χρωματίδων [63]. Για να γίνει αυτό η διαχωριστάση πέπτει ενζυμικά την υπομονάδα Scc1 στην μίτωση ή την Rec8 στην μείωση, που είναι υπομονάδες των δακτυλίων της κοεσύνης που συγκρατούν τις αδελφές χρωματίδες ενωμένες κοντά στο κεντρομερές κατά των διαχωρισμό των χρωμοσωμάτων στην ανάφαση της μίτωσης αλλά και την υπομονάδα Rec8 στην ανάφαση της μείωσης I. Ο διαχωρισμός των χρωμοσωμάτων είναι μια σημαντική διεργασία που καθώς εξελίσσεται υπόκειται λεπτομερές έλεγχο από το κύτταρο και η δράση της διαχωριστάσης είναι ελεγχόμενη και δρα αυστηρά κατά την μετάβαση από την μετάφαση στην ανάφαση. Στην αρχή της κυτταρικής διαίρεσης πριν την ανάφαση βρίσκεται συνδεδεμένη με την σεκιουρίνη η οποία εμποδίζει την σύνδεση της διαχωριστάσης με το υπόστρωμα της. Έπειτα η σεκιουρίνη ουβικουιτινώνεται και πρωτεολύεται πριν την

ανάφαση και η διαχωριστάση είναι ελεύθερη να δράσει και να πέψει την κοεσύνη ελευθερώνοντας τις αδελφές χρωματίδες. Επίσης η φωσφορυλίωση που δέχεται η διαχωριστάση είναι ένας άλλος μηχανισμός ρύθμισης της που δρα αρνητικά για την δράση της. Απουσία λειτουργικής διαχωριστάσης έχει ως αποτέλεσμα την γονιδιωματική αστάθεια και την πολυπλοειδία, χαρακτηριστικό του καρκίνου [63].



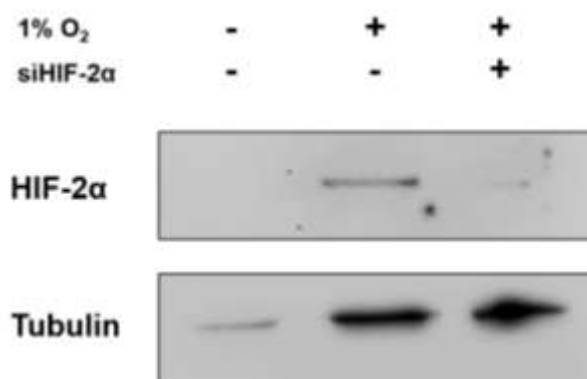
Εικόνα 5.3: Η δράση της διαχωριστάσης στον διαχωρισμό αδελφών χρωματίδων, Marston, A., et al (2014). Molecular and Cellular Biology [64]

5.3 Πειραματική Μελέτη ελέγχου των αποτελεσμάτων της βιοπληροφορικής Ανάλυσης

Η βιοπληροφορική ανάλυση μας παρείχε δεδομένα για τα γονίδια που αλλάζει σημαντικά η έκφρασή τους και ο HIF-2α πιθανόν να έχει κάποιον ρυθμιστικό ρόλο στην μεταγραφή τους. Επομένως ο επόμενος στόχος της έρευνας ήταν από τα γονίδια που ο HIF-2α ελέγχει θετικά να επιλέξουμε κάποια και να μελετήσουμε πειραματικά την αλλαγή της έκφρασής τους σε τρεις συνθήκες: στην νορμοξία, την υποξία και την υποξία με αποσιώπηση του HIF-2α προκειμένου να επιβεβαιώσουμε τα αποτελέσματα της βιοπληροφορικής ανάλυσης πειραματικά σε ηπατοκαρκίνωμα και επομένως να βρούμε αν ο HIF-2α έχει ρόλο στην αντίστοιχες διεργασίες στις οποίες συμμετέχουν τα γονίδια.

5.3.1 Έλεγχος αποσιώπησης του HIF-2α

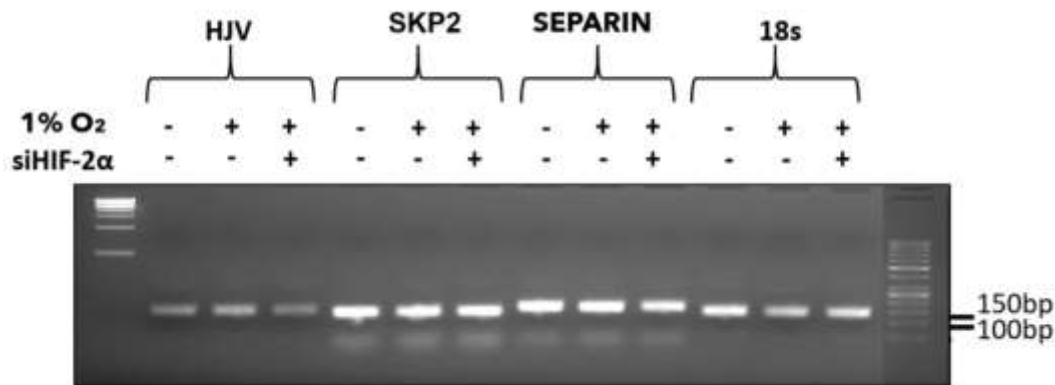
Προκειμένου να επιβεβαιώσουμε τα αποτελέσματα της βιοπληροφορικής ανάλυσης, αρχικά πραγματοποιήθηκε αποσιώπηση του HIF-2α σε κύτταρα ηπατοκαρκινώματος Huh7, σύμφωνα με τη μέθοδο που περιγράφηκε παραπάνω. Τα πρωτεϊνικά λύματα αναλύθηκαν με ανοσοαποτύπωση κατά Western με τη χρήση κατάλληλων αντισωμάτων. Ως πρωτεΐνη ελέγχου χρησιμοποιήθηκε η τουμπουλίνη, η έκφραση της οποίας είναι γνωστό ότι δεν επηρεάζεται από τις διαφορές στις συνθήκες καλλιέργειας ή από την αποσιώπηση του μεταγραφικού παράγοντα HIF-2α στα κύτταρα. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την ηλεκτροφόρηση και την ανοσοαποτύπωση δείχνουν ότι ο μεταγραφικός παράγοντας HIF-2α δεν είναι οπτικά εμφανής στη νορμοξία και δεν ανιχνεύεται σε σημαντικές ποσότητες. Στη συνθήκη της υποξίας, εμφανίζεται μία καθαρά σχηματισμένη ζώνη, με τον HIF-2α να ανιχνεύεται σε αυξημένα επίπεδα και να δίνει έντονο σήμα. Στην τρίτη συνθήκη, με την αποσιώπηση του HIF-2α στην υποξία, εντοπίζεται μία αδρή ζώνη, επιβεβαιώνοντας την αποσιώπηση του HIF-2α σε μεγάλο βαθμό. Στη συνέχεια, με χρήση της τουμπουλίνης ως πρωτεΐνη κανονικοποίησης, υπολογίζουμε τα επίπεδα ανίχνευσης του HIF-2α για τη δεύτερη συνθήκη της υποξίας και την τρίτη συνθήκη της υποξίας με αποσιώπηση του HIF-2α. Υπολογίζεται ότι η αποσιώπηση του HIF-2α είναι της τάξης του 78%.



Εικόνα 5.4: Western Blot με αντισώματα για τον HIF-2α και την τουμπουλίνη των δειγμάτων της RT-qPCR. Αφορά αριστερά προς τα δεξιά τις συνθήκες: Νορμοξία, Υποξία, Υποξία-αποσιώπηση HIF-2α

5.3.2 Ενισχυμένα τμήματα των γονιδίων HJV, SKP2, SEPARIN

Για την τεκμηριωμένη επιβεβαίωση της επιτυχούς RT-PCR και την εξαγωγή δεδομένων για τα ενισχυμένα τμήματα των επιλεγμένων γονιδίων, χρησιμοποιήσαμε πηκτή αгарόζης 2% και εισάγαμε τα δείγματα της qPCR. Η πηκτή αгарόζης που έτρεξε με όλα τα δείγματα για κάθε γονίδιο και για κάθε συνθήκη φαίνεται στην εικόνα (βλέπε 5.6). Τα φθορίζοντα τμήματα που αναγνωρίστηκαν αντιστοιχούν στα στοχευμένα τμήματα των γονιδίων με τους εκκινητές.



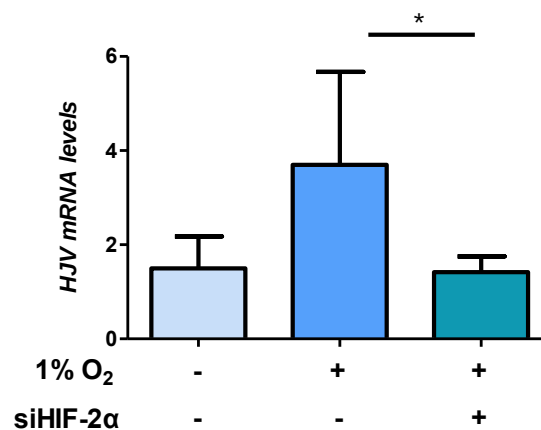
Εικόνα 5.6: Πηκτή αгарόζης των δειγμάτων της RT-qPCR. Αφορά τα γονίδια HJV, SKP2, SEPARIN και 18s control και για κάθε γονίδιο από τα αριστερά προς τα δεξιά τις συνθήκες: Νορμοξία, Υποξία, Υποξία-αποσιώπηση HIF-2α

Τα ενισχυμένα τμήματα είναι οπτικά διευκρινή και μας παρέχουν χρήσιμα πληροφοριακά στοιχεία. Πρωτίστως, επιβεβαιώνεται η ενίσχυση των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών. Οι έντονες ζώνες ταυτίζονται σε μήκος με τα αναμενόμενα μήκη των ενισχυμένων τμημάτων και υπολογίζονται στη πηκτή βάσει του δείκτη 50 kb στα 100-120 kb, ενώ το ενισχυμένο τμήμα του γονιδίου SKP2 φαίνεται να έχει διανύσει μεγαλύτερη απόσταση, αναλογώντας σε μήκος περίπου 154 kb. Συνεπώς, επιβεβαιώνεται η στοχευμένη και επιτυχής ενίσχυση των τμημάτων με τους εκκινητές για τα τρία γονίδια σε κάθε συνθήκη, για τα συνολικά 9 δείγματα. Πρέπει να αναφερθεί η παρατήρηση της ύπαρξης πιθανών διμερών εκκινητών του γονιδίου SKP2, το οποίο λήφθηκε υπόψη κατά την επανάληψη του πειράματος RT-PCR και θεωρήθηκε απαραίτητη η αύξηση της θερμοκρασίας κατά στο στάδιο της υβριδοποίησης.

Αναφορικά με τη συνθήκη αποσιώπησης στην υποξία σε σύγκριση με τη συνθήκη της υποξίας, φαίνεται με προσεκτική παρατήρηση μειωμένη ένταση, η οποία φυσιολογικά είναι ανάλογη των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων και η ζώνη μπορεί να διακρίνεται εντονότερη είτε λιγότερο έντονη σε κάθε γονίδιο. Η λιγότερη ορατή ζώνη της επαγωγής του HJV είναι σύμφωνη με τα αποτελέσματα της qPCR. Ωστόσο, η παρατήρηση της έντασης των ζωνών δεν αποτελεί κάποιο τελείως αξιόπιστο αποτέλεσμα αλλά μια ένδειξη της επιτυχίας της υπόθεσης του πειράματος RT-PCR.

5.3.3 Έκφραση των γονιδίων HJV, SKP2, SEPARIN με αποσιώπηση του HIF-2α στην υποξία

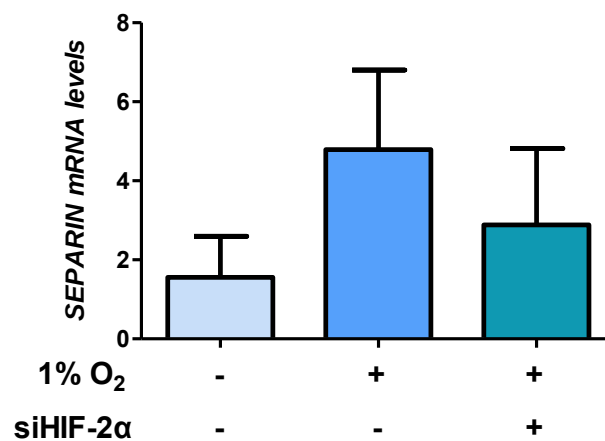
Η αντίδραση πραγματικού χρόνου PCR (RT-PCR) πραγματοποιήθηκε για την πειραματική ενίσχυση των αποτελεσμάτων της μεταγραφομικής ανάλυσης, επιβεβαιώνοντάς τα στατιστικά και βιολογικά μέσω της επανάληψης του πειράματος. Η RT-PCR που πραγματοποιήθηκε αφορούσε τα γονίδια ενδιαφέροντος HJV, SKP2, SEPARIN



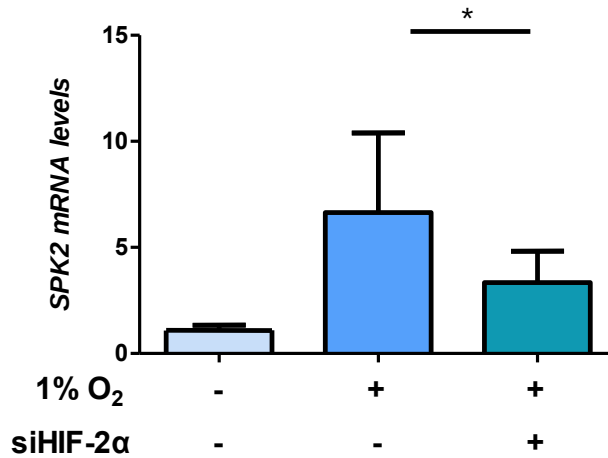
Διάγραμμα 5.10: Ραβδόγραμμα των επιπέδων υποστρώματος στην RT-qPCR. Περιγράφει την ποσότητα μεταγράφων mRNA για το γονίδιο της HJV. Από τα αριστερά προς τα δεξιά η κάθε μπάρα αντιστοιχεί στην συνθήκη: Νορμοξία (ανοιχτό μπλε), Υποξία(σκούρο μπλε), Υποξία-αποσιώπηση HIF-2α (γαλαζοπράσινο)

Για το γονίδιο HJV, είναι εμφανής η αύξηση της έκφρασής του κατά 2 φορές στην υποξία σε σύγκριση με τη νορμοξία, γεγονός που αποδεικνύει τη θετική ρύθμισή του από τον μεταγραφικό παράγοντα HIF-2α. Με την αποσιώπηση του HIF-2α στην υποξία, παρατηρείται στατιστική μείωση της έκφρασης του γονιδίου HJV, στα επίπεδα έκφρασης που παρατηρούνται στη νορμοξία.

Το γονίδιο SKP2 παρουσιάζει την μεγαλύτερη επαγωγή στην υποξία από τη νορμοξία, ενώ στην συνθήκη αποσιώπησης η έκφρασή του μειώνεται στατιστικά, όχι όμως σε ίσα επίπεδα της νορμοξίας, δηλαδή ο HIF-2α δεν είναι ο μόνος επαγωγέας του.



Διάγραμμα 5.12: Ραβδόγραμμα των επιπέδων υποστρώματος στην RT-qPCR. Περιγράφει την ποσότητα μεταγράφων mRNA για το γονίδιο της SEPARIN. Από τα αριστερά προς τα δεξιά η κάθε μπάρα αντιστοιχεί στην συνθήκη: Νορμοξία (ανοιχτό μπλε), Υποξία(σκούρο μπλε), Υποξία-αποσιώπηση HIF-2α (γαλαζοπράσινο)



Διάγραμμα 5.11: Ραβδόγραμμα των επιπέδων υποστρώματος στην RT-qPCR. Περιγράφει την ποσότητα μεταγράφων mRNA για το γονίδιο της SKP2. Από τα αριστερά προς τα δεξιά η κάθε μπάρα αντιστοιχεί στην συνθήκη: Νορμοξία (ανοιχτό μπλε), Υποξία(σκούρο μπλε), Υποξία-αποσιώπηση HIF-2α (γαλαζοπράσινο)

Τέλος, το γονίδιο SEPARIN παρουσιάζει παρόμοια αποτελέσματα. Η έκφρασή του γονιδίου επιδεικνύει αυξητική τάση στην υποξία σε σχέση με τη νορμοξία κατά 3 φορές, η οποία τείνει να μειώνεται με την αποσιώπηση του μεταγραφικού παράγοντα HIF-2^α ομοίως με την SKP2.

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η χαμηλή συγκέντρωση οξυγόνου στα κύτταρα ονομάζεται υποξία και είναι ένα φαινόμενο που συναντάται σε φυσιολογικές και παθολογικές καταστάσεις, όπως ο καρκίνος. Οι κύριοι ρυθμιστές της ομοιόστασης του οξυγόνου είναι οι μεταγραφικοί παράγοντες HIF οι οποίοι μεταβάλλουν την έκφραση πολλών γονιδίων συμβάλλοντας στην προσαρμογή των κυττάρων στην υποξία. Ωστόσο, δεν είναι ακόμη πλήρως γνωστό το πλήθος των γονιδίων που ρυθμίζονται από τους HIF καθώς και ποια ισομορφή είναι υπεύθυνη για τη ρύθμιση αυτών των γονιδίων.

Στην παρούσα μελέτη ασχοληθήκαμε με την μελέτη του HIF-2α για την εύρεση νέων πιθανών ρόλων του εστιάζοντας στην αναζήτηση άγνωστων μέχρι τώρα γονιδίων που ρυθμίζει στην υποξία σε κύτταρα ηπατοκαρκινώματος Huh7. Έτσι η εργασία είχε δύο κύριες κατευθύνσεις. Η πρώτη αφορά την βιοπληροφορική επεξεργασία RNA-seq δεδομένων με σκοπό την ανάλυση γονιδίων των οποίων η έκφρασή ρυθμίζονται θετικά ή αρνητικά από την αποσιώπηση του μεταγραφικού παράγοντα HIF-2α στην υποξία. Η δεύτερη κατεύθυνση της εργασίας αφορά την πειραματική μελέτη της έκφρασης επιλεγμένων γονιδίων που στην μεταγραφομική ανάλυση ρυθμίζονται στατιστικά θετικά από τον HIF-2α.

Από την μεταγραφομική ανάλυση για τον HIF-2α στην υποξία απορρέει πως ο HIF-2α συμμετέχει στην ρύθμιση γονιδίων που σχετίζονται με διάφορα μεταβολικά μονοπάτια, με την ομοιόσταση μεταλλικών ιόντων και με την αγγειογένεση ωστόσο διαπιστώσαμε ότι η ρύθμισή του επεκτείνεται και σε γονίδια του κυτταρικού κύκλου ένα μέρος του ρόλου του HIF-2α που μέχρι τώρα δεν έχει μελετηθεί εκτενώς. Στα αποτελέσματα της μεταγραφομικής ανάλυσης εντοπίστηκαν 411 γονίδια που αλλάζει σημαντικά η έκφρασή τους με την αποσιώπηση του HIF-2α. Από αυτά 224 αυξάνεται στατιστικά η έκφρασή τους, ενώ 187 μειώνεται στατιστικά η έκφρασή τους. Ακολούθησε ανάλυση οντολογίας η οποία ανέδειξε κυτταρικούς μηχανισμούς που συμμετέχουν τα γονίδια αυτά. Πολλά γονίδια τόσο με αυξημένη αλλά και μειωμένη στατιστικά έκφραση εμπλέκονται σε διάφορα γνωστά μεταβολικά μονοπάτια. Επίσης γονίδια που συμμετέχουν στην αγγειογένεση εντοπίζονται με μειωμένη ή αυξημένη έκφραση (GAB1, TSC2, PTPN3). Ιδιαίτερο ενδιαφέρον στα αποτελέσματα της ανάλυσης οντολογίας ήταν ο εντοπισμός γονιδίων με στατιστικά μειωμένη έκφραση που συμμετέχουν στον κυτταρικό κύκλο όπως στην μετάβαση G1-S φάση και στην μίτωση.

Λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω, η παρούσα μελέτη επικεντρώθηκε περισσότερο στην μελέτη και την επιβεβαίωση της ρύθμισης γονιδίων του κυτταρικού κύκλου που φαίνεται πως ρυθμίζει ο HIF-2α από την μεταγραφομική ανάλυση. Μελετήθηκαν τα γονίδια SKP2 και SEPARIN που αφορούν τον κυτταρικό κύκλο και το HJV ένα γονίδιο της ομοιόστασης του σιδήρου του οποίου προηγουμένως είχε μελετηθεί η σχέση του με τον HIF-1α αλλά όχι για τον HIF-2α. Το γονίδιο διαχωριστάση SEPARIN έχει πολύ σημαντικό ρόλο στην κυτταρική διαίρεση και την μίτωση. Κωδικοποιεί την διαχωριστάση η οποία διαθέτει ενζυμική δράση και είναι υπεύθυνη για τον διαχωρισμό των αδελφών χρωματίδων με την πέψη της κοεσίνης στα κεντρομερή, ενώ έχει βρεθεί ότι απώλεια του ενζύμου αυτού οδηγεί σε πολυπλοειδία ένα πιθανό χαρακτηριστικό των καρκινικών κυττάρων. Ειδικότερα όπως αναφέρθηκε το γονίδιο SKP2 (πρωτεΐνης 2 που σχετίζεται με κινάση της φάσης S, S-phase-kinase associated-protein-2), κωδικοποιεί την SKP2 πρωτεΐνη. Η SKP2 είναι μία κύρια ρυθμιστική πρωτεΐνη του κυτταρικού κύκλου. Ο ρόλος της είναι η ρύθμιση πρωτεϊνών που καθορίζουν την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου που τις οδηγεί σε πρωτεόλυση. Επίσης το γονίδιο αιμοτζουβελίνη HJV είναι το κύριο γονίδιο που συμβάλει στον μεταβολισμό και την ομοιόσταση του σιδήρου στο ήπαρ. Κωδικοποιεί την αιμοτζουβελίνη μία μεμβρανοσύνδετη πρωτεΐνη που οδηγεί στην μείωση της απορρόφησής του σιδήρου και της ανακύκλωσής του από μακροφάγα σε κατάσταση υπερφόρτωσης σιδήρου στον οργανισμό. Αυτό επιτυγχάνει με την ενεργοποίηση της μεταγραφής της επιδίνης της κύριας ορμόνης ρύθμισης της ομοιόστασης του σιδήρου που παράγεται στο ήπαρ.

Αρχικά αναζητήσαμε στη βιβλιογραφία για γνωστά σημεία πρόσδεσης του HIF-2 σε πιθανά HREs στους υποκινητές των γονιδίων αλλά ωστόσο μετά από μελέτη στην γονιδιακή αλληλουχία των υποκινητών των HJV, SKP2, SEPARIN εντοπίζονται πιθανές θέσεις HREs που μπορεί να προσδένεται ο HIF-2α οι οποίες δεν είναι επιβεβαιωμένες στις προηγούμενες έρευνες της βιβλιογραφίας [65-68]. Οι αλληλουχίες των γονιδίων εξετάστηκαν ανοδικά σε μήκος 3500bp του υποκινητή και εντοπίσαμε μοτίβα HREs και στα τρία γονίδια (HJV, SKP2, SEPARIN). Αναλυτικά στην αλληλουχία ανοδικά του υποκινητή του γονιδίου HJV εντοπίζεται ένα πιθανό σημείο HRE. Στο γονίδιο SKP2 εντοπίζονται τέσσερα πιθανά σημεία πρόσδεσης του HIF-2α και στο γονίδιο SEPARIN πέντε πιθανά μοτίβα HREs.

Τα αποτελέσματα της μεταγραφομικής ανάλυσης έδειξαν μια σημαντική μείωση της έκφρασης των τριών αυτών γονιδίων απουσία του HIF-2α σε υποξία με μεγάλη στατιστική σημαντικότητα $p\text{-value}<0.05$ και με μείωση της έκφρασής τους μεγαλύτερη από 100%.

Προκειμένου να επιβεβαιωθεί η βιοπληροφορική ανάλυση τα γονίδια αιμοτζουβελίνη (HJV), πρωτεΐνη 2 που σχετίζεται με κινάση φάσης S (SKP2), διαχωριστάση (SEPARIN) μελετήθηκαν και πειραματικά μετά από καλλιέργεια κύτταρα Huh7 με αποσιώπηση του HIF-2α σε συνθήκες υποξίας. Τα αποτελέσματα δείχναν αρχικά ότι και τα τρία γονίδια παρουσιάζουν αυξημένη έκφραση στην υποξία σε σύγκριση με την νορμοξία. Για το γονίδιο HJV παρατηρείται μείωση της έκφρασης κατά 2 φορές με στατιστική σημαντικότητα, όταν ο HIF-2α βρίσκεται σε αποσιώπηση. Ομοίως στο γονίδιο SKP2 μειώνεται η έκφραση του κατά 5 φορές το οποίο συμβαίνει με στατιστική σημαντικότητα σε σύγκριση με την υποξία. Επίσης μελετώντας την έκφραση του γονιδίου της SEPARIN βρέθηκε να έχει μειωμένη έκφραση στην συνθήκη αποσιώπησης του HIF-2α ωστόσο τα πρώτα αυτά πειράματα δεν ήταν στατιστικά σημαντικά.

Όσον αφορά για το γονίδιο της HJV που στο ήπαρ ρυθμίζει την έκφραση της εψιδίνης διακρίνεται πως με την αποσιώπηση του HIF2-α η έκφρασή του γονιδίου επανέρχεται στα νορμοξικά επίπεδα, πιθανόν αποδεικνύοντας πως ο HIF-2 είναι ο κύριος επαγωγέας του γονιδίου HJV σε συνθήκες υποξίας. Τα αποτελέσματα της RT-qPCR έδειξαν μειωμένη έκφραση των γονιδίων απουσία του HIF-2α σε συνθήκες υποξίας και επιβεβαίωσαν την βιοπληροφορική ανάλυση.

Στην παρούσα έρευνα για πρώτη φορά αποδεικνύεται ότι ο μεταγραφικός παράγοντας HIF-2α επάγει τα γονίδια HJV, SKP2 και SEPARIN. Επομένως, αναδεικνύεται για πρώτη φορά πρωτίστως πως ο HIF-2α συμμετέχει στην ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου της ρύθμισης των SKP2 και SEPARIN αλλά και στην ομοιόσταση του σιδήρου με την επαγωγή του γονιδίου HJV. Επίσης όπως αναφέρθηκε και τα τρία γονίδια φέρουν μοτίβα HREs κάποια από τα οποία πιθανόν να αποτελούν λειτουργικά σημεία πρόσδεσης του HIF-2α μέλλει να ερευνηθεί. Από τη παρούσα διπλωματική επιβεβαιώνεται ακόμη μια φορά ο ρόλος του HIF-2α στην προσαρμογή των καρκινικών κυττάρων του ήπατος σε συνθήκες υποξίας και η μελέτη του μπορεί να βοηθήσει στην εύρεση θεραπειών όπως για τον καρκίνο του ήπατος.

Βιβλιογραφία

1. McKeown, S.R., *Defining normoxia, physoxia and hypoxia in tumours-implications for treatment response*. Br J Radiol, 2014. **87**(1035): p. 20130676.
2. Nakayama, K. and N. Kataoka, *Regulation of Gene Expression under Hypoxic Conditions*. Int J Mol Sci, 2019. **20**(13).
3. Quintero, M., et al., *Mitochondria as signaling organelles in the vascular endothelium*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(14): p. 5379-84.
4. Dengler, V.L., M. Galbraith, and J.M. Espinosa, *Transcriptional regulation by hypoxia inducible factors*. Crit Rev Biochem Mol Biol, 2014. **49**(1): p. 1-15.
5. Befani, C. and P. Liakos, *The role of hypoxia-inducible factor-2 alpha in angiogenesis*. J Cell Physiol, 2018. **233**(12): p. 9087-9098.
6. Makino, Y., et al., *Inhibitory PAS domain protein (IPAS) is a hypoxia-inducible splicing variant of the hypoxia-inducible factor-3alpha locus*. J Biol Chem, 2002. **277**(36): p. 32405-8.
7. Chen, C. and T. Lou, *Hypoxia inducible factors in hepatocellular carcinoma*. Oncotarget, 2017. **8**(28): p. 46691-46703.
8. Guo, Y., et al., *Hypoxia-inducible factors in hepatocellular carcinoma (Review)*. Oncol Rep, 2020. **43**(1): p. 3-15.
9. Zhao, J., et al., *The role of hypoxia-inducible factor-2 in digestive system cancers*. Cell Death Dis, 2015. **6**(1): p. e1600.
10. Iyer, N.V., et al., *Cellular and developmental control of O₂ homeostasis by hypoxia-inducible factor 1 alpha*. Genes Dev, 1998. **12**(2): p. 149-62.
11. Peng, J., et al., *The transcription factor EPAS-1/hypoxia-inducible factor 2alpha plays an important role in vascular remodeling*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(15): p. 8386-91.
12. Tian, H., et al., *The hypoxia-responsive transcription factor EPAS1 is essential for catecholamine homeostasis and protection against heart failure during embryonic development*. Genes Dev, 1998. **12**(21): p. 3320-4.
13. Palazon, A., et al., *HIF transcription factors, inflammation, and immunity*. Immunity, 2014. **41**(4): p. 518-28.
14. Haase, V.H., *Regulation of erythropoiesis by hypoxia-inducible factors*. Blood Rev, 2013. **27**(1): p. 41-53.
15. Koury, S.T., M.C. Bondurant, and M.J. Koury, *Localization of erythropoietin synthesizing cells in murine kidneys by in situ hybridization*. Blood, 1988. **71**(2): p. 524-7.
16. Hu, C.J., et al., *Differential roles of hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) and HIF-2alpha in hypoxic gene regulation*. Mol Cell Biol, 2003. **23**(24): p. 9361-74.
17. Nauta, T.D., et al., *Identification of HIF-2alpha-regulated genes that play a role in human microvascular endothelial sprouting during prolonged hypoxia in vitro*. Angiogenesis, 2017. **20**(1): p. 39-54.

18. Watts, D., et al., *Hypoxia signaling pathway: A central mediator in endocrine tumors*. Front Endocrinol (Lausanne), 2022. **13**: p. 1103075.
19. McNeill, L.A., et al., *Hypoxia-inducible factor prolyl hydroxylase 2 has a high affinity for ferrous iron and 2-oxoglutarate*. Mol Biosyst, 2005. **1**(4): p. 321-4.
20. Koivunen, P., et al., *Catalytic properties of the asparaginyl hydroxylase (FIH) in the oxygen sensing pathway are distinct from those of its prolyl 4-hydroxylases*. J Biol Chem, 2004. **279**(11): p. 9899-904.
21. Gkoutinakou, I.M., et al., *ERK1/2 phosphorylates HIF-2alpha and regulates its activity by controlling its CRM1-dependent nuclear shuttling*. J Cell Sci, 2019. **132**(7).
22. Pangou, E., et al., *HIF-2alpha phosphorylation by CK1delta promotes erythropoietin secretion in liver cancer cells under hypoxia*. J Cell Sci, 2016. **129**(22): p. 4213-4226.
23. Filippopoulou, C., G. Simos, and G. Chachami, *The Role of Sumoylation in the Response to Hypoxia: An Overview*. Cells, 2020. **9**(11).
24. Chen, R., et al., *The acetylase/deacetylase couple CREB-binding protein/Sirtuin 1 controls hypoxia-inducible factor 2 signaling*. J Biol Chem, 2012. **287**(36): p. 30800-11.
25. Minisini, M., E. Cricchi, and C. Brancolini, *Acetylation and Phosphorylation in the Regulation of Hypoxia-Inducible Factor Activities: Additional Options to Modulate Adaptations to Changes in Oxygen Levels*. Life (Basel), 2023. **14**(1).
26. Koh, M.Y., et al., *The hypoxia-associated factor switches cells from HIF-1alpha- to HIF-2alpha-dependent signaling promoting stem cell characteristics, aggressive tumor growth and invasion*. Cancer Res, 2011. **71**(11): p. 4015-27.
27. Gkoutinakou, I.M., et al., *Novel HIF-2alpha interaction with Reptin52 impairs HIF-2 transcriptional activity and EPO secretion*. Biochem Biophys Res Commun, 2021. **557**: p. 143-150.
28. Yang, S.H., et al., *The ETS domain transcription factor Elk-1 contains a novel class of repression domain*. Mol Cell Biol, 2002. **22**(14): p. 5036-46.
29. Salnikow, K., et al., *Regulation of hypoxia-inducible genes by ETS1 transcription factor*. Carcinogenesis, 2008. **29**(8): p. 1493-9.
30. Sharrocks, A.D., *The ETS-domain transcription factor family*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2001. **2**(11): p. 827-37.
31. Besnard, A., et al., *Elk-1 a transcription factor with multiple facets in the brain*. Front Neurosci, 2011. **5**: p. 35.
32. Aprelikova, O., et al., *Role of ETS transcription factors in the hypoxia-inducible factor-2 target gene selection*. Cancer Res, 2006. **66**(11): p. 5641-7.
33. Elvert, G., et al., *Cooperative interaction of hypoxia-inducible factor-2alpha (HIF-2alpha) and Ets-1 in the transcriptional activation of vascular endothelial growth factor receptor-2 (Flk-1)*. J Biol Chem, 2003. **278**(9): p. 7520-30.
34. Pawlus, M.R. and C.J. Hu, *Enhanceosomes as integrators of hypoxia inducible factor (HIF) and other transcription factors in the hypoxic transcriptional response*. Cell Signal, 2013. **25**(9): p. 1895-903.
35. Asafo-Agyei, K.O. and H. Samant, *Hepatocellular Carcinoma*, in StatPearls. 2024: Treasure Island (FL) ineligible companies. Disclosure: Hrishikesh Samant declares no relevant financial relationships with ineligible companies.
36. Balogh, J., et al., *Hepatocellular carcinoma: a review*. J Hepatocell Carcinoma, 2016. **3**: p. 41-53.

37. Waller, L.P., V. Deshpande, and N. Pyrsopoulos, *Hepatocellular carcinoma: A comprehensive review*. World J Hepatol, 2015. **7**(26): p. 2648-63.
38. Hamaguchi, T., et al., *Glycolysis module activated by hypoxia-inducible factor 1alpha is related to the aggressive phenotype of hepatocellular carcinoma*. Int J Oncol, 2008. **33**(4): p. 725-31.
39. Xia, L., et al., *The TNF-alpha/ROS/HIF-1-induced upregulation of FoxM1 expression promotes HCC proliferation and resistance to apoptosis*. Carcinogenesis, 2012. **33**(11): p. 2250-9.
40. Yan, W., et al., *PI3 kinase/Akt signaling mediates epithelial-mesenchymal transition in hypoxic hepatocellular carcinoma cells*. Biochem Biophys Res Commun, 2009. **382**(3): p. 631-6.
41. Zhang, Q., et al., *Wnt/beta-catenin signaling enhances hypoxia-induced epithelial-mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma via crosstalk with hif-1alpha signaling*. Carcinogenesis, 2013. **34**(5): p. 962-73.
42. Wiesener, M.S., et al., *Widespread hypoxia-inducible expression of HIF-2alpha in distinct cell populations of different organs*. FASEB J, 2003. **17**(2): p. 271-3.
43. Geis, T., et al., *HIF-2alpha-dependent PAI-1 induction contributes to angiogenesis in hepatocellular carcinoma*. Exp Cell Res, 2015. **331**(1): p. 46-57.
44. Wang, X., et al., *HIF-2-dependent expression of stem cell factor promotes metastasis in hepatocellular carcinoma*. Cancer Lett, 2017. **393**: p. 113-124.
45. Wang, X., et al., *Stem cell factor is a novel independent prognostic biomarker for hepatocellular carcinoma after curative resection*. Carcinogenesis, 2014. **35**(10): p. 2283-90.
46. He, C., et al., *Downregulating hypoxia-inducible factor-2alpha improves the efficacy of doxorubicin in the treatment of hepatocellular carcinoma*. Cancer Sci, 2012. **103**(3): p. 528-34.
47. Kawamoto, M., et al., *Identification of Characteristic Genomic Markers in Human Hepatoma HuH-7 and Huh7.5.1-8 Cell Lines*. Front Genet, 2020. **11**: p. 546106.
48. Silvestri, L., A. Pagani, and C. Camaschella, *Furin-mediated release of soluble hemojuvelin: a new link between hypoxia and iron homeostasis*. Blood, 2008. **111**(2): p. 924-31.
49. Rodriguez Martinez, A., O. Niemela, and S. Parkkila, *Hepatic and extrahepatic expression of the new iron regulatory protein hemojuvelin*. Haematologica, 2004. **89**(12): p. 1441-5.
50. Papanikolaou, G., et al., *Mutations in HFE2 cause iron overload in chromosome 1q-linked juvenile hemochromatosis*. Nat Genet, 2004. **36**(1): p. 77-82.
51. Ganz, T., *Hepcidin, a key regulator of iron metabolism and mediator of anemia of inflammation*. Blood, 2003. **102**(3): p. 783-8.
52. Babitt, J.L., et al., *Bone morphogenetic protein signaling by hemojuvelin regulates hepcidin expression*. Nat Genet, 2006. **38**(5): p. 531-9.
53. Lin, L., Y.P. Goldberg, and T. Ganz, *Competitive regulation of hepcidin mRNA by soluble and cell-associated hemojuvelin*. Blood, 2005. **106**(8): p. 2884-9.
54. Braliou, G.G., et al., *2-Oxoglutarate-dependent oxygenases control hepcidin gene expression*. J Hepatol, 2008. **48**(5): p. 801-10.
55. Wilkinson, K.D., *Protein ubiquitination: a regulatory post-translational modification*. Anticancer Drug Des, 1987. **2**(2): p. 211-29.

56. Spratt, D.E., et al., *Selective recruitment of an E2~ubiquitin complex by an E3 ubiquitin ligase*. J Biol Chem, 2012. **287**(21): p. 17374-17385.
57. Kulathu, Y. and D. Komander, *Atypical ubiquitylation - the unexplored world of polyubiquitin beyond Lys48 and Lys63 linkages*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2012. **13**(8): p. 508-23.
58. Lee, Y. and H.S. Lim, *Skp2 Inhibitors: Novel Anticancer Strategies*. Curr Med Chem, 2016. **23**(22): p. 2363-79.
59. Wu, L., et al., *Specific small molecule inhibitors of Skp2-mediated p27 degradation*. Chem Biol, 2012. **19**(12): p. 1515-24.
60. Kitagawa, M., S.H. Lee, and F. McCormick, *Skp2 suppresses p53-dependent apoptosis by inhibiting p300*. Mol Cell, 2008. **29**(2): p. 217-31.
61. Wang, G., et al., *Novel roles of Skp2 E3 ligase in cellular senescence, cancer progression, and metastasis*. Chin J Cancer, 2012. **31**(4): p. 169-77.
62. Wang, Z., et al., *Skp2 is a promising therapeutic target in breast cancer*. Front Oncol, 2012. **1**(57).
63. Luo, S. and L. Tong, *Structure and Function of the Separase-Securin Complex*. Subcell Biochem, 2021. **96**: p. 217-232.
64. Marston, A.L., *Shugoshins: tension-sensitive pericentromeric adaptors safeguarding chromosome segregation*. Mol Cell Biol, 2015. **35**(4): p. 634-48.
65. Lee, M.C., et al., *Genome-wide analysis of HIF-2alpha chromatin binding sites under normoxia in human bronchial epithelial cells (BEAS-2B) suggests its diverse functions*. Sci Rep, 2016. **6**: p. 29311.
66. Mole, D.R., et al., *Genome-wide association of hypoxia-inducible factor (HIF)-1alpha and HIF-2alpha DNA binding with expression profiling of hypoxia-inducible transcripts*. J Biol Chem, 2009. **284**(25): p. 16767-16775.
67. Schodel, J., et al., *High-resolution genome-wide mapping of HIF-binding sites by ChIP-seq*. Blood, 2011. **117**(23): p. e207-17.
68. Smythies, J.A., et al., *Inherent DNA-binding specificities of the HIF-1alpha and HIF-2alpha transcription factors in chromatin*. EMBO Rep, 2019. **20**(1).